



**La greffe de thymus humain lors de l'humanisation des
souris NOD/SCID/IL2R γ ^{null}: optimisation du modèle pour
l'étude de la fonction des lymphocytes T humains *in vivo***

Par

Chloé COLAS

Département de Microbiologie d'Immunologie et d'Infectiologie
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures en vue de l'obtention du
grade de doctorat en microbiologie et immunologie

Octobre 2019

© Chloé Colas, 2019

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

**La greffe de thymus humain lors de l'humanisation des souris NOD/SCID/IL2R γ ^{null}:
optimisation du modèle pour l'étude de la fonction des lymphocytes T humain *in vivo***

présentée par:
Chloé Colas

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Petronela Ancuta
président-rapporteur

Elie Haddad
directeur de recherche

Philippe Begin
membre de jury

Marc-André Langlois
examineur externe

Julie Autmizguine
représentant du doyen

« Le progrès des sciences est l'ouvrage du temps et de la hardiesse de l'esprit »

Voltaire (1751)

REMERCIEMENTS

Merci à mon jury de thèse : **Dr. Ancuta, Dr. Begin, Dr. Langlois et Dr. Autmizguine** pour votre encadrement. Un grand merci à **Dr. Cohen, Olga et Tram** pour leur collaboration.

Ensuite, je tiens évidemment à remercier mon directeur de thèse, le **docteur Elie Haddad**, de m'avoir acceptée dans son laboratoire. Travailler avec vous aura été une sacrée aventure dans mon parcours. A vos côtés, j'ai découvert l'incarnation d'un mot en une personne: la passion. Vous êtes passionné par ce que vous faites, ce que vous voyez, ce que vous entendez, ça en devient parfois difficile de vous suivre mais ça n'a rendu l'expérience que plus enrichissante! Qui ne rêve pas de faire un travail qui le passionne comme vous passionne le vôtre? J'espère en tout cas vous suivre dans ce chemin là! Merci pour cette belle opportunité.

Un grand merci ensuite aux 'parents' du labo : **Silvia Selleri, Kathie Beland et Panojot Bisha**. Des parents très pédagogues qui doivent parfois nous rappeler à l'ordre, mais surtout qui donnent un encadrement exemplaire, le lab' ne tournerait clairement pas aussi bien sans vous (et cela s'est confirmé avec le départ de Silvia il y a quelques mois..).

A very special thank you to **Dr. Yuanyi Li** : obviously you are full part of this PhD, I couldn't have done it without you and for sure those lines won't be enough to show how grateful I am to have had you with me for this adventure. You are not only a very precious member of this team (master of mice !) but also a nice, funny and interesting person.

Un gros merci à mes « boys » du lab' : **Simon, William, Aurélien et Hugo**. J'ai beaucoup trop de choses à dire pour que ça ne tienne qu'en quelques lignes mais vous savez bien mes Kevin qu'avec vous la mer noire n'a jamais été autant remplis de vidéos de chats et raton-laveurs (kamoulox, bravo), continuez comme çô. Evidemment ça n'aurait pas été pareil sans la présence des filles **Camille** (et **Mathieu et Pipette**), **Isabelle, Mélanie** puis **Delphine et Harika**. J'oublie évidemment plein d'autres gens de passages au labo qui ont rendu l'expérience encore plus délirante !

Merci au labo Beauséjour : **Christian, Basma, Lina, Gaël, Cynthia** et plus anciennement **Kerstin**. Le divorce a été difficile à accepter mais finalement il s'est vraiment fait à l'amiable, et surtout sans rien changer à notre solidarité. Un soutien important dans l'aventure.

Il y a ensuite plein d'autres personnes au centre de recherche dont la présence a été importante même au delà des relations professionnelles, elles se reconnaîtront ici, but I have to make a special mention to **Andrea** who really supported me during the last two worst years, thanks a lot for having been there for me.

Evidemment (et heureusement) le succès d'une thèse ne se résume pas qu'au cercle du travail. Donc tout d'abord, un énorme merci à **Nayyara**, c'est toi qui m'a non seulement donnée une raison de venir ici, mais qui a su et sait toujours être cette amie parfaite dont tout le monde a besoin dans sa vie, en plus d'être un modèle de réussite, de sagesse et d'ambition. Avec **Rahim**, je vous souhaite à tous les deux juste ce qui vous méritez : le plus grand bonheur du monde ! D'ailleurs, sans elle, je n'aurais pas rencontrée ces amis si précieux aujourd'hui : **Rehana, Elise, Ludo et Arafat**. Un grand merci à votre soutien, qui a été complété par le (re)découverte de **Justine**, cette fois on ne se quittera plus ! **Marie B.**, depuis la prépa on en aura eu des années de galères et je ne pensais pas qu'on se retrouverait à Montréal 10 ans (tout pile) plus tard dans la même situation mais ça y est ! On y est ! On est au bout alors un énorme merci et surtout un grand « bon courage » pour ta dernière ligne droite.

Cette thèse aura aussi vu naître et grandir deux bébés importants : le plus beau des filleuls **Paul** et la plus belle des nièces **Éléonore** mais a aussi vu partir quelqu'un d'important, mon **Papi** gâteau... J'espère qu'avec **Faty**, je vous rends fière là où vous êtes.

Un grand merci à ma famille, à mes grands-mères **Maminon** et **Mamilie**, j'espère que j'aurais autant la pêche que toi à 90 ans ! Et surtout un gigantesque merci à la fratrie : **Chrystel, Caro, Daminou et Cyril**. La vie de famille comme on en rêve : rires, soutien et engueulades, même à distance je vis ça tout pareil avec vous.

Et enfin merci aux plus importants, sans qui tout cela n'aura pas été possible, les meilleurs parents (en toute objectivité car j'ai pas mal comparé pendant la crise d'ado). **Papa, maman**, tout n'est jamais parfait mais pourtant votre présence, vos connaissances, votre culture, votre soutien, votre écoute, vos conseils, tout ça a été sans faille. On ajoute à cela une bonne dose d'humour, de l'autodérision et quatre enfants merveilleux et on frise la famille parfaite nan ? Merci.

RESUMÉS ET MOTS-CLÉS

Aujourd'hui, l'un des modèles de souris humanisées le plus robuste est obtenu en injectant des cellules souches hématopoïétiques humaines (HSC) issues de foie fœtal humain et en implantant du thymus fœtal autologue. Ce modèle, appelé BLT (*Bone marrow/Liver/Thymus*), s'est révélé capable de supporter une reconstitution, une maturation et une sélection optimales des cellules T. Les souris BLT sont utilisées pour de nombreuses études telles que la compréhension de la biologie du VIH ou plus récemment en médecine régénérative. Grâce à ce modèle, nous avons pu d'une part étudier le rôle des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) lors de l'infection par le VIH mais aussi mieux comprendre la formation *in vivo* de tératomes lors de l'utilisation d'iPSC. Cependant, l'une des principales limites de cette technique réside dans l'obtention du tissu fœtal. Ici, nous avons décrit un nouveau protocole de souris humanisées greffées avec du thymus humain en utilisant des matériaux plus accessibles: du thymus humain retiré lors d'une chirurgie cardiaque chez des nouveaux-nés ou des enfants, et des HSC de sang de cordon. Des morceaux de ces thymus ont été implantés dans les quadriceps de souris immunodéficientes, après avoir été mis en culture. Ces souris CCST (*Cord blood and Cardiac Surgery Thymus*) ont permis une prise de greffe importante et un meilleur développement des lymphocytes T humains que les souris humanisées sans thymus. Les lymphocytes T des souris CCST et BLT ont montré une fonction similaire, évaluée par des tests de prolifération *ex vivo* et par rejet de lignées de cellules leucémiques allogéniques *in vivo*. Nous avons testé l'intérêt de cette nouvelle stratégie dans le modèle de l'infection au VIH-1, qui représente le modèle type de l'utilité des BLT. Nous avons montré que les souris CCST sont sensibles à l'infection par le VIH-1 par voie muqueuse ou intrapéritonéale, comme l'indique la détection de l'ADN du VIH et des cellules p24 +, similairement aux souris BLT. Les souris CCST ont présenté des réponses de lymphocytes T spécifiques du VIH-1 *ex vivo* plus efficaces que les BLT. Lors du traitement antirétroviral, les souris CCST, comme les BLT, ont vu leur charge virale diminuer. Ces résultats démontrent que les souris CCST représentent une alternative au modèle de souris BLT classique. Ces thymus, éthiquement plus facile à obtenir, peuvent être utilisés pour générer un grand nombre de souris par rapport aux thymus fœtaux.

Mots-clés: souris humanisée, cellules souches hématopoïétiques, souris immunodéficiente, thymus, BLT, tissu fœtal, reconstitution immunitaire, VIH, thérapie antirétrovirale

ABSTRACT AND KEYWORDS

Immunodeficient mice engrafted with human immune system provide an exciting *in vivo* model for a better understanding of its functioning and for development of new therapies. Today, one of the most robust humanized mouse model is achieved by injecting human hematopoietic stem cells (HSC) from fetal liver along with an implantation of autologous fetal thymic tissue. This model, called BLT, was shown to be able to support an optimal T cell reconstitution, maturation and selection. BLT mice are extensively used for many studies such as understanding HIV biology or in regenerative medicine. Indeed, our work used BLT mice on one hand to study the role of plasmacytoid dendritic cells (pDC) during the HIV infection and on the other hand to better understand the formation of teratomas from iPSCs *in vivo*. However, one of the biggest limitations of this technique is the procurement of the fetal tissue. Here we describe a new protocol to do humanized mice engrafted with human thymus pieces by using more accessible materials: human thymus obtained during cardiac surgery and cord blood HSC. Indeed, thymus is spontaneously removed during cardiac surgery in neonates and young children, thus it is an easy and ethical way to obtain this tissue. Those thymuses pieces were implanted in the quadriceps of a immunodeficient mice, after being put in culture. CCST mice (Cord blood and Cardiac Surgery Thymus) exhibited a significant engraftment of T-cells, compared to humanized mice without thymus. T-cells from both CCST and BLT mice showed a similar function as evaluated by proliferation assays upon PHA stimulation *ex vivo* and rejection of allogeneic leukemic cells lines *in vivo*. CCST mice were susceptible to HIV-1 infection via mucosal or intraperitoneal route, as shown by detectable viral load, HIV DNA and p24+ cells, at similar levels to those of BLT mice. Importantly, CCST mice displayed more effective *ex vivo* HIV-1-specific T-cell responses compared to BLT. Upon antiretroviral treatment, CCST mice, like BLT, were able to diminish the viral load. Our data suggest that CCST mice represent an alternative to the regular BLT mouse model. Those easy-to-access thymuses can be used to generate a large number of mice compared to fetal thymuses.

Keywords: humanized mice, hematopoietic stem cell, immunodeficient mouse, thymus, BLT, fetal tissue, immune reconstitution, HIV, antiretroviral therapy

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

CHAPITRE 1 - INTRODUCTION	25
Figure 1. Le développement des principales souches de souris immunodéficientes	29
Tableau I. Comparaison des différents modèles de souris immunodéficientes	30
Figure 2. Les étapes de maturation des lymphocytes T dans le thymus	37
Figure 3. Les différentes techniques d'humanisation des souris immunodéficientes	41
Tableau II. Les agents infectieux étudiés chez les souris humanisées.....	48
Figure 4. La structure et la composition du VIH	51
Figure 5. Les mécanismes d'entrée du VIH dans la cellule hôte.....	52
Figure 6. Le cycle de réplication du VIH dans la cellule hôte.....	53
Figure 7. Évolution du compte de lymphocytes CD4 ⁺ (bleu) et de la charge virale.....	56
(rouge) au cours du temps suivant l'infection d'un individu par le VIH	56
Figure 8. Activation des lymphocytes CD4 ⁺ et CD8 ⁺ par interaction avec une cellule.....	61
présentatrice d'antigène.....	61
Figure 9. Les différents phénotypes d'activation des lymphocytes CD4 ⁺	64
CHAPITRE 2 - PREMIER ARTICLE	83
Figure 1. HIV infection induces depletion of pDCs in humanized mice	103
Figure 2. Flt3L treatment reduces HIV infection in humanized mice	104
Figure 3. Flt3L treatment helps maintain pDC levels during HIV infection	106
Figure 4. Flt3L treatment reduces HIV replication via a pDC-dependent process.....	107
Figure 5. pDCs from Flt3L-treated mice are more prone to express IFN α following TLR7	
stimulation ex vivo.....	109
Figure 6: pDC ability to make IFN α in response to TLR7 stimulation is decreased during HIV	
infection	111
Figure 7: Flt3L-mediated control of HIV replication is driven by early enhancement of IFN-I	
responses.	113
Figure S1. Gating strategy to identify immune cell subsets and HIV-infected T cells	115
figure S2. Flt3L treatment expands dendritic cells subsets in NSG mice	116
Figure S3. Flt3L treatment reduces HIV replication of HIV T/F in hu-mice	117

Figure S4. Investigating a potential therapeutic effect of Flt3L in HIV infection of humanized mice.....	118
Figure S5. The role of pDCs in HIV infection in the presence or absence of Flt3L treatment .	119
Figure S6. No significant proliferation by splenic pDCs from hu-mice treated or not with Flt3L	120
Figure S7. Blocking IFN-I signaling inhibits ISG synthesis in vivo	121
Supplemental Table 1. Characteristics of humanized mice used in study	122
Supplemental Table 2: List of Abs used for flow cymetry	123
CHAPITRE 3 - DEUXIÈME ARTICLE	131
Figure 1. Injection of NK cells is sufficient to prevent the formation of hiPSC-derived teratomas in Hu-AT mice.	144
Figure 2. hiPSCs are the target of NK but not T cells <i>in vitro</i>	145
Figure 3. hiPSCs efficiently develop into teratomas in Hu-BLT mice lacking functional NK cells.	148
Figure 4. Established teratomas are not the target of NK cells in Hu-AT mice.	150
Figure S1. Phenotypic characterization of hiPSCs.	152
Figure S2. Purification strategies for the adoptive transfer of human immune cells.....	153
Figure S3. Peripheral blood immune reconstitution in Hu-BLT mice.....	154
Figure S4. HLA-I acquisition of hiPSCs in differentiation medium.	155
Table 1: List of used antibodies	156
Table 2: List of all hiPSC clones used and their sources	156
CHAPITRE 4 - TROISIÈME ARTICLE	161
Figure 1. Pediatric thymus from cardiac surgery can be used as an alternative to fetal thymus.	182
Figure 2. Unlike humanized mice mouse without thymus, CCST and BLT humanized models allowed robust T cells reconstitution.	185
Figure 3. Functional T-cells are developing in CCST and BLT mice.	186
Figure 4. CCST mice can be infected by HIV-1 and are comparable to the BLT mouse model.	189

Figure 5. HIV-1-specific T-cell response is more robust in CCST mice compared to BLT mice.	191
Supplemental Figure 1. Comparison of the different treatments used before transplanting the cardiac surgery thymus in mouse.....	193
Supplemental Figure 2. Gating strategy for flow cytometry analysis to identify human immune cell subsets, including HIV-infected T-cells.....	195
CHAPITRE 5 - DISCUSSION.....	199
Tableau III. Comparaison des différents modèles de souris humanisées	200
Figure 10. Les utilisations principales du tissu fœtal en recherche	209
CHAPITRE 6 - CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	211
Figure 11. Modèle humanisée PDX avec un système immunitaire autologue	212

ABREVIATIONS

AAV	vecteur viral adéno-associé
ADN	acide désoxyribonucléique
AIDS	syndrome de l'immunodéficience acquise
AML	leucémie myéloïde aïgue
APC	cellules présentatrices d'antigènes
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ART	thérapie antirétrovirale
AZT	Zidovudine
BLT	<i>Bone-Marrow/Liver/Thymus</i>
BRG	C.129(Cg)Rag2tm1FwaIL2rgtm1Sug/Jic
CCST	<i>Cord Blood and Cardiac Surgery Thymus</i>
CD	cluster de différenciation
DC	cellules dendritiques
DN	double négatif
dNTP	désoxynucléosides triphosphatés
DP	double positive
EBV	virus d'Epstein-Barr
EC	<i>elite controllers</i>
EMA	European Medicine Agency
FDA	United States Food and Drug Administration
Foxn1 ^{nu}	<i>forkhead box N1</i>
G-CSF	facteur humain stimulant les colonies de granulocytes
GM-CSF	facteur humain stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages
GVHD	réaction du greffon contre l'hôte
HIV	virus de l'immunodéficience humaine
HLA	antigènes des leucocytes humains

HSC	cellules souches hématopoïétiques
humHSC	humanisées avec des CSH
humPBMC	humanisées avec des PBMC
IFN γ	interféron- γ
IFN α	interféron α
IgG/IgM	immunoglobuline G / immunoglobuline M
IL-X	interleukine-X
iPSC	cellules souches pluripotentes induites
KIR	récepteurs <i>killer immunoglobulin-like</i>
Lta	lymphotoxine- α
LTC	lymphocyte T cytotoxique
LTR	séquences terminales longues répétées
MHC	complexe majeur d'histocompatibilité
MHCI	complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
MHCII	complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
MIP-1 α	<i>macrophage inflammatory protein-1α</i>
MISTRG	BRG exprimant le M-CSF, l'IL-3, le GM-CSF, le TPO et le SIRP- α humains
MITRG	BRG exprimant le M-CSF, l'IL-3, le GM-CSF et le TPO humains
NF- κ B	<i>nuclear factor-kappa B</i>
NK	cellules <i>natural killer</i>
NNRTIs	inhibiteurs de la transcriptase inverse non-nucléoside
NOD	diabétiques non-obèses
NOG	NOD.Cg-Prkdc ^{scid} IL2rg ^{tm1} Sug
NRG	NOD.129S7(B6)-Rag1 ^{tm1} IL2 ^{rgtm1} Wjl/Sz
NRTIs	inhibiteurs de la transcriptase inverse analogues aux nucléosides
NSG	NOD.Cg-Prkdc ^{scid} IL2rg ^{tm1} Wjl/Sz
OMS	Organisme Mondial de la Santé
PBMC	cellules mononuclées du sang périphérique
pDC	cellule dendritique plasmacytoïde
PDX	xénogreffe dérivée du patient
pre-DP	double positive précoce

PHA	Phytohaemagglutinine P
Prkdc	<i>protein kinase, DNA activated catalytic polypeptide</i>
<i>Rag1</i>	gène activant la recombinaison V(D)J 1
<i>Rag2</i>	gène activant la recombinaison V(D)J 2
RSV	virus respiratoire syncytial
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquis
SCF	facteur humain de croissance des cellules souches
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SGM3	exprimant l'IL-3 humaine, le GM-CSF humain, et le SCF humain
SIV	virus de l'immunodéficience simienne
SP	simples positives
SPF	<i>specific free-pathogen</i>
SVIH	Virus de l'immunodéficience chimère simienne et humaine
TCR	récepteur des cellules T
TEC	cellules épithéliales thymiques
Th	lymphocytes T helper
TKO	<i>triple knock-out</i> B6.129(Cg) Rag2 ^{tm1} FwaCd47 ^{tm1} Fplll2rg ^{tm1} Wjl/J41
TLR	<i>toll like receptor</i>
TNF- α	<i>tumor necrosis factor-α</i>
TPO	thrombopoïétine
Tregs	cellules T régulatrices
VEGF	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	7
RESUMÉS ET MOTS-CLÉS	9
ABSTRACT AND KEYWORDS	11
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	13
ABREVIATIONS.....	17
SOMMAIRE.....	21
CHAPITRE 1 - INTRODUCTION	25
I. Les souris humanisées.....	25
I.1. Les souris immunodéficientes.....	25
I.1.1. La souris SCID.....	25
I.1.2 Les souris NOD/SCID	27
I.1.3. Les souris NOD/Rag.....	28
I.2. La mutation de récepteur à l'IL-2	28
I.3. L'humanisation des souris immunodéficientes.....	32
I.3.1. Les méthodes d'implantation des PBMC ou des HSCs.....	32
I.3.2 Les souris humanisées avec des PBMC	33
I.3.3 Les souris humanisées avec des HSC	34
I.3.4. Le développement des lymphocytes dans le thymus murin.....	36
I.3.5 Les souris Bone-Marrow/Liver/Thymus.....	40
I.4. L'optimisation des souris immunodéficientes	42
I.4.1. Limiter les effets de la GvHD	42
I.4.2. L'ajout des molécules HLA de classe I et II.....	43
I.4.3. Les souris SGM3.....	44
I.4.4. Les souris MITRG et MISTRG	44
I.5. Les souris humanisées comme modèle préclinique de maladies humaines.....	45
I.5.1. Les souris humanisées et les tumeurs.....	45
I.5.2. Les souris humanisées et les maladies infectieuses	48
II. Le virus de l'immunodéficience humaine.....	50
II.1. Origine et structure du VIH	50
II.2. Le cycle de réplication du VIH.....	52

II.3. L'infection par le VIH	54
II.4. Les facteurs influençant l'infection par le VIH	56
II.5. Les réponses immunitaires induites lors de l'infection par le VIH	57
II.5.1. Les cellules « Natural Killer »	57
II.5.2. Les lymphocytes B	58
II.5.3. Les lymphocytes CD8 ⁺	60
II.5.4. Les lymphocytes CD4 ⁺	63
II.5.5. Les cellules dendritiques.....	66
II.6. La thérapie antirétrovirale.....	67
II.6.1. Les différentes classes de thérapie antirétrovirale	68
II.6.2. L'utilisation de la thérapie antivirale	70
II.7. Un virus spécifique à l'homme : un challenge pour les études <i>in vivo</i>	72
II.7.1 Les modèles de souris humanisées infectées par le VIH	72
II.7.2. Etude de la transmission du virus et sa prévention	73
II.7.3 Etude de la réplication du VIH dans les souris humanisées	74
II.7.4. Etude de la latence du VIH dans les souris humanisées	75
II.7.5. Les thérapies contre les VIH par les anticorps monoclonaux.....	76
III. Projet de recherche	79
III.1. Problématique et mise en contexte du projet de recherche	79
III.2. Objectif du projet de recherche	80
III.3. Hypothèse	81
CHAPITRE 2 - PREMIER ARTICLE	83
I. Mise en contexte	83
II. Abstract	85
III. Introduction.....	86
IV. Results	88
V. Discussion	93
VI. Materials and Methods	96
VII. Figures	102
1. Main figures	102
2. Supplemental figures and tables.....	115
VIII. References	124
CHAPITRE 3 - DEUXIÈME ARTICLE	131
I. Mise en contexte	131

II. Abstract	133
III. Introduction.....	134
IV. Results	135
V. Discussion	138
VI. Materials and Methods	140
VII. Figures	143
VII.1. Main figures	143
VII.2 Supplemental figures and tables	151
VIII. References	157
CHAPITRE 4 - TROISIÈME ARTICLE.....	161
I. Mise en contexte	161
II. Abstract	164
III. Introduction.....	165
IV. Results	167
V. Discussion	172
VI. Materials and Methods	177
VII. Figures	182
VII.1. Main figures	182
VII.2. Supplemental figures and tables	193
VIII. References	196
CHAPITRE 5 - DISCUSSION.....	199
I. L'optimisation du modèle des souris humanisées	200
I.1. Les souris humanisées et les lymphocytes B	201
I.2. Le rôle des cytokines dans les souris humanisées.....	203
I.3. Les souris humanisées et les cellules NK	204
I.4. Les souris humanisées et la médecine régénérative.....	206
II.5. Le singe vs les souris humanisées	207
II. Le tissu fœtal en recherche	208
II.1. La controverse sur l'utilisation des tissus fœtaux en recherche aux Etats-Unis.....	208
II.2. Les alternatives au tissu fœtal en recherche	209
CHAPITRE 6 - CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	211
BIBLIOGRAPHIE.....	215

CHAPITRE 1 - INTRODUCTION

I. Les souris humanisées

Les modèles animaux jouent un rôle irremplaçable aujourd'hui dans la recherche scientifique et les études précliniques. Les primates non-humains, tels que les singes rhésus et les chimpanzés, sont très similaires à l'homme en terme de bagage génétique et de statut physiologique. Cependant, ce sont des espèces en danger, difficiles d'accès, onéreuses, et dont l'utilisation est très contrôlée et restreinte par les comités d'éthique en expérimentation animale. Les petits modèles animaux tels que les souris, les rats et les lapins sont certes plus accessibles mais sont beaucoup plus éloignés de l'homme en terme de génétique, de métabolisme et d'anatomie. Ainsi, leurs spécificités les rendent moins optimaux pour une utilisation dans les modèles précliniques. De précédentes études précliniques utilisant des petits animaux ont abouti à des résultats assez divergents, mettant ainsi en évidence le besoin urgent de développer un modèle fiable pour ces expérimentations.

I.1. Les souris immunodéficientes

Pour surmonter les limites du modèle murin dans le domaine de l'immunologie, le modèle de souris humanisées a alors été créé. On appelle ici souris humanisées des souris immunodéficientes qui ont été transplantées avec du matériel humain et/ou qui ont été modifiées génétiquement pour produire des transgènes humains. Ainsi, les souris immunodéficientes ont fortement évolué au cours de ces dernières décennies afin d'optimiser le modèle humanisé.

I.1.1. La souris SCID

La première grande étape dans le développement de ces souris a été la découverte en 1962 par Isaacson et Cattanach de souris appelées *nude*, en raison de l'absence de poils¹. Ces souris n'ont pas de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ matures en raison d'une mutation du gène *forkhead box N1* (Foxn1^{nu}) qui mène à un développement défectueux des cellules du stroma, et elles sont donc athymiques^{2,3}. En l'absence de lymphocytes T fonctionnels, la souris devrait

alors être incapable de monter une réaction immunitaire contre une xélogreffe, telle qu'une greffe de cellules humaines. Cependant, les résultats des différentes études menées avec ce modèle ont démontré que certains cancers humains pouvaient effectivement être greffés et se développer mais malheureusement, aucun tissu humain sain n'était capable de prendre⁴. Il est donc apparu évident que le développement d'un modèle murin plus hautement immunodéficient que celui-ci devenait nécessaire.

Le développement plus poussé des souris humanisées a ainsi débuté à la fin des années 1980 après la découverte de la mutation *scid* (*severe combined immunodeficiency*, (SCID)) chez les souris ayant un fond génétique CB17⁵. Il a été démontré par la suite que ces gènes *scid* codent pour la *protein kinase, DNA activated catalytic polypeptide* (Prkdc). La mutation de cette protéine kinase impliquée dans la réparation de l'ADN empêche ainsi le réarrangement des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines et des récepteurs des lymphocytes T⁶. Ces souris développent donc un syndrome SCID qui résulte en un dysfonctionnement de la différenciation des lymphocytes T et B ainsi qu'une forte radiosensibilité⁶. En conséquence, ces souris, qui ont une espérance de vie réduite à moins d'un an, sont alors d'excellents modèles pour investiguer comment la différenciation lymphoïde est affectée dans ce syndrome et ainsi mieux comprendre sa régulation en général.

Plusieurs approches ont alors été utilisées pour tester l'humanisation des souris SCID⁷⁻⁹. Moiser et al. ont injecté des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) par voie intraveineuse ou intra péritonéale, permettant ainsi le développement de cellules T, B, macrophages et monocytes humains⁷. Dans ce modèle SCID-PBMC, une réponse aux anticorps humains spécifiques contre l'anatoxine tétanique a été détectée, ce qui a permis aux souris de survivre au moins 6 mois. Cependant, les T générés chez ces souris sont majoritairement des T matures dérivés des cellules du donneur et reconnaissent uniquement les antigènes des leucocytes humains (HLA). Ainsi, les lymphocytes ici sont incapables de d'interagir avec des cellules présentatrices d'antigènes (APC) de la souris. Au même moment, un autre modèle de souris humanisée SCID était généré en implantant du thymus, du foie, des ganglions lymphatiques ou de la rate fœtale humaine, suivi d'une injection d'hépatocytes HLA compatibles issus de foie fœtal humain⁸. Ce modèle a résulté en la génération d'une vague transitoire de cellules T CD4⁺, CD8⁺ et des immunoglobuline G (IgG) en périphérie, mais sans développement de compartiment myéloïde⁸. Namikawa établit ainsi la première lignée de souris

humanisées porteuses du syndrome d'immunodéficience humaine en infectant ces souris SCID humanisées avec le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1)¹⁰.

Bien que les PBMC humains ou les cellules de foie fœtal peuvent être greffés avec succès dans les souris SCID, l'utilisation de cellules souches hématopoïétiques (HSC) humaines CD34⁺ purifiées restait encore à optimiser. Plusieurs groupes ont ensuite été capables de démontrer que des souris CB17 SCID préalablement irradiées étaient aussi capables de supporter la différenciation et le développement des progéniteurs CD34⁺ issus de cellules du sang de cordons ou de moelle osseuse en plusieurs lignées cellulaires^{9,11}. Dick et al. ont greffé par voie intraveineuse des HSC issues de la moelle osseuse humaine et infusées les souris SCID avec de l'interleukine-3 humaine (IL-3), le facteur humain stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF) et le facteur humain de croissance des cellules souches (SCF). Ce protocole a permis de détecter les progéniteurs myéloïdes chez les souris receveuses, ce qui a donc confirmé que la transplantation était possible à long terme et qu'elle pouvait être multipotentielle¹².

Ces modèles ont donc été le pilier fondateur pour les modèles de souris humanisées afin d'étudier les maladies hématopoïétiques ou infectieuses humaines. Cependant, la prise de greffe restait encore très faible, l'injection de cellules humaines ne résultait encore qu'en des cellules humaines très partiellement fonctionnelles, particulièrement au niveau des lymphocytes T qui étaient quasi-inexistants.

1.1.2 Les souris NOD/SCID

Afin de générer un modèle murin humanisé permettant un plus haut taux de prise de greffe, Shultz et al. ont croisé les souris SCID avec des souris diabétiques non-obèses (NOD/Lt)¹³. Ces souris NOD/Lt Sz-scid (figure 1) présentent alors un défaut important en lymphocyte T, B et en cellules *natural killer* (NK) ainsi qu'une dysfonction des cellules dendritiques (DC), supportant ainsi une bonne prise de greffe lors d'injection de PBMC¹⁴. En effet, en comparaison avec le modèle souris CB17-SCID, le niveau de cellules NK endogène dans ce modèle est remarquablement plus bas, il n'y a plus de complément hémolytique et les macrophages sont fonctionnellement immatures, facilitant ainsi une meilleure prise de greffe. La greffe des souris NOD/SCID avec des HSC humaines a ainsi permis d'obtenir un taux plus haut

de reconstitution du système immunitaire. Cependant, les cellules T ne se développent toujours pas dans ce modèle^{15,16}. Ce modèle a tout de même été très utile dans une grande variété d'études portant sur la compréhension de l'hématopoïèse, la pathogénie de l'infection par des virus spécifiques à l'humain etc¹⁶⁻²⁰. Par ailleurs, en raison de l'apparition de lymphome thymique et en l'absence d'un système immunitaire complètement développé et fonctionnel, l'espérance de vie de ces souris était en moyenne de 8,5 mois, et ce dans des conditions spécifiques d'élevage sans pathogène (*specific free-pathogen (SPF) conditions*)¹³.

1.1.3. Les souris NOD/Rag

En parallèle, un autre type de modèle de souris immunodéficientes a été mis en place, en mutant les gènes activant la recombinaison V(D)J *rag1* et *rag2* chez les souris NOD^{21,22} (figure 1). Cette mutation rend la production de lymphocytes T et B matures impossible en empêchant les recombinaisons V(D)J lors de la création des répertoires T et B^{23,24}. Ces souris immunodéficientes sont ainsi très utiles pour recevoir des transplantations de cellules humaines mais elles présentent plusieurs limites dans leur utilisation. Cependant, cela avait aussi pour effet d'augmenter la production de cellules NK, ce qui a aussi impacté négativement la prise de greffe HSC chez ces souris NOD-Rag.

1.2. La mutation de récepteur à l'IL-2

C'est pourquoi entre 2002 et 2005, quatre différents groupes se sont intéressés alors à l'ajout de la mutation sur la chaîne γ du récepteur à l'IL-2. En effet, chez l'homme, une déficience en cette molécule cause un SCID. Ce récepteur est indispensable pour les voies de signalisation de l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7, l'IL-9, l'IL-15 et l'IL-21 et une déficience dans la chaîne γ bloque le développement des cellules NK et ajoute de nouveaux dysfonctionnements dans l'immunité innée et adaptative²⁵. Ces mutations *IL2rg*^{null}, qui incluent *IL2rg*^{tm1Wjl}, *IL2rg*^{tm1Sug}, *IL2rg*^{tm1Krf} et *IL2rg*^{tm1Cgn} ont été ajoutées aux modèles scid, Rag1 ou Rag2 résultant en ces trois principaux modèles : NSG [NOD.Cg-Prkdc^{scid}IL2rg^{tm1Wjl}/Sz]²⁶, NOG [NOD.Cg-Prkdc^{scid}IL2rg^{tm1Sug}]²⁷, NRG [NOD.129S7(B6)-Rag^{1tm1Mom}IL2rg^{tm1Wjl}/Sz]²⁸, BRG [C.129(Cg)Rag2^{tm1Fwa}IL2rg^{tm1Sug}/Jic]²⁹ (figure 1). Ces souris sont donc déficientes en cellules NK, en lymphocytes matures et ont une réponse immunitaire innée très perturbée. De plus, elles

ne développent pas de lymphomes thymiques et ont donc une plus grande espérance de vie³⁰⁻³². Traggiai et ses collègues³³ furent les premiers à décrire le modèle dans lequel des souris néonatales $RAG2/\gamma c^{null}$ ont été transplantées avec des HSC issues de sang de cordons et injectées par voie intrahépatique. Avec ce modèle, des lymphocytes T matures humains ont été générés dans le thymus murin, la rate et les ganglions lymphatiques à des taux bien plus hauts que les précédents modèles. Des résultats similaires ont ensuite été observés³⁴ en utilisant le modèle NOD/SCID/ γc^{null} . Enfin, de nombreuses autres études ont démontré que l'utilisation de souris adultes NOD/SCID/ γc^{null} ou $Rag2/\gamma c^{null}$, au lieu de nouveau-nées, permettait aussi d'obtenir une importante reconstitution immunitaire.

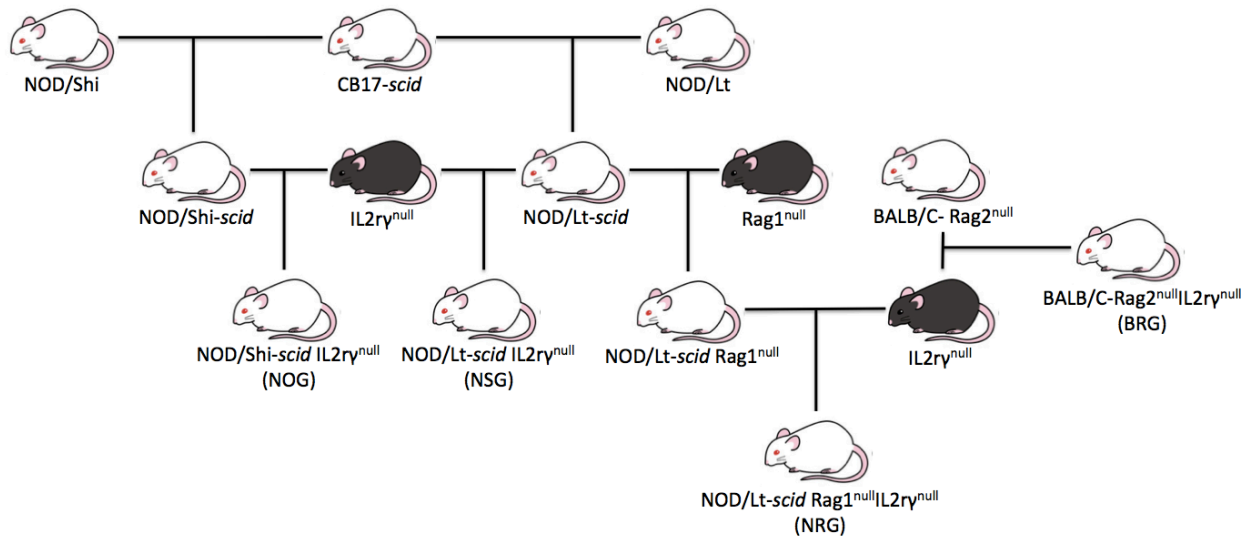


Figure 1. Le développement des principales souches de souris immunodéficientes

Ainsi, les souris porteuses de la mutation $IL-2rg^{null}$ en combinaison avec les mutations *scid*, $Rag1^{null}$ et/ou $Rag2^{null}$ montrent une bien meilleure capacité à soutenir la prise de greffe et le développement de cellules hémato-lymphoïdes humaines fonctionnelles à partir de fractions de cellules $CD34^{+}$ issues de la moelle osseuse ou de sang de cordon.

Tableau I. Comparaison des différents modèles de souris immunodéficientes

Adapté de Arch Immunol Ther Exp février 2018 doi: 10.1007/s00005-018-0506-x, autorisation de modifier et

diffuser selon la licence Creative Commons Attribution 4.0 International

(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Nom de la souche	C.B-17- <i>scid</i>	NOD- <i>scid</i>	BRG	NOG	NSG	NRG
mutations	CB17- <i>Pkrdc</i> ^{scid/j}	NOD.CB17- <i>Pkrdc</i> ^{scid/j}	BALB/C- <i>Rag2</i> ^{null} <i>IL2rγ</i> ^{null}	NOD/Shi- <i>scid</i> <i>IL2rγ</i> ^{null}	NOD/Lt- <i>scid</i> <i>IL2rγ</i> ^{null}	NOD/Lt- <i>scid</i> <i>Rag1</i> ^{null} <i>IL2rγ</i> ^{null}
méthode de transplantation des cellules humaines	HSC	HSC PBMC BLT PDX	HSC PBMC	HSC PBMC BLT PDX	HSC PBMC BLT PDX	HSC PBMC BLT PDX
limites du modèle	- rejet de greffe - durée de vie courte - système immunitaire inné intact - développement spontané de lymphome thymique	- limité dans les études sur le cancer - développement spontané de lymphome thymique	- développement spontané de lymphome thymique	- limité dans les études sur le cancer - apparition de métastases tumorales	- limité dans les études sur le cancer - cellules souches système immunitaire	- limité dans les études sur le cancer
Etudes majeures réalisées	- GvHD	- diabète de type I - études sur le cancer	- études sur le cancer - maladie infectieuse - système immunitaire	- cellules souches - système immunitaire - maladie infectieuse - études sur le cancer - tests de médicaments	- cellules souches - système immunitaire - maladie infectieuse - études sur le cancer - tests de médicaments	- cellules souches - système immunitaire - maladie infectieuse - études sur le cancer - tests de médicaments

Cellules dendritiques	oui	altéré	altéré	altéré	altéré	altéré
Macrophages	oui	altéré	altéré	altéré	altéré	altéré
Cellules NK	oui	non	non	non	non	non
Cellules B matures	non	non	non	non	non	non
Cellules T matures	non	non	non	non	non	non
Complément	oui	non	non	non	non	non
Tolérance à l'irradiation	faible	faible	forte	faible	faible	plus haute dose nécessaire
Développement de lymphome	haute	haute	faible	non	non	faible
Espérance de vie moyenne	< 12 mois	< 10 mois	---	> 18 mois	> 18 mois	---
Références	35-37	38,39	33, 47, 48	41,42	43,44	45-47

Ces études ont aussi donc mis en évidence l'importance de la souche de souris utilisée. En effet, dans le cas de HSC purifiés de sang de cordon injectés dans des souris adultes BRG, moins de 1% de cellules hCD45⁺ étaient détectées dans la moelle osseuse, ce qui est drastiquement inférieur à ce qui était observé dans les souris NSG ou NOG⁴⁸. Bien que les raisons de cette différence restent peu claires, l'hypothèse alors émise était que la mutation NOD entraînait de plus nombreux défauts dans l'immunité innée de la souris¹³. En effet, des analyses génétiques plus poussées des différents loci ont révélé que cette différence dans la prise de greffe était due à un polymorphisme dans le gène *sirpa* qui code pour la protéine α (SIRP- α)⁴⁹. Ce polymorphisme génétique entraîne l'interaction entre la protéine SIRP- α présente sur les cellules myéloïdes murines et le ligand CD47 des HSC humaines⁵⁰. Cette forte interaction résulte en un signal inhibiteur, appelé le signal « don't eat me », et permet ainsi aux cellules humaines

d'échapper aux mécanismes de mort cellulaire par inhibition de la phagocytose par les macrophages murins⁵¹. C'est pourquoi, pour les souris n'étant pas sur fond NOD, plusieurs méthodes ont été utilisées afin d'induire cette tolérance basée sur les mêmes mécanismes : soit en introduisant le gène humain *sirpa* par différentes technologies de « knock-in » dans la souris⁵², soit en forçant l'expression du CD47 murin dans les cellules humaines transplantées⁵³, soit en empêchant l'expression du CD47 murin par un « knock-out » du gène, créant ainsi un modèle appelé le triple « knock-out » (TKO) B6.129(Cg)-Rag2^{tm1Fwa}Cd47^{tm1Fpl}Il2rg^{tm1Wjl}/J⁵⁴. Ce dernier modèle a donc permis de démontrer que les phagocytes murins se développant dans un environnement CD47 négatif deviennent tolérant envers les cellules n'exprimant pas CD47⁵⁴.

I.3. L'humanisation des souris immunodéficientes

I.3.1. Les méthodes d'implantation des PBMC ou des HSCs

En plus de la grande variété de souris immunodéficientes disponibles, il y a aussi plusieurs approches disponibles pour la transplantation des cellules humaines chez ces souris. En ce qui concerne les souris humanisées avec des PBMC (souris humPBMC), les approches standards sont une injection par voie intraveineuse ou par voie intra-péritonéale chez des souris jeunes adultes⁷. Dans le cas des souris humanisées avec des HSC (souris humHSC), il y a plusieurs variables à considérer. Les HSC peuvent donc être obtenues à partir de moelle osseuse, de sang de cordon, de foie fœtal ou de PBMC. Il a été montré que les cellules issues de sang de cordon ou de foie fœtal sont plus efficaces pour reconstituer un système immunitaire chez la souris, tandis qu'il est plus difficile d'obtenir un grand nombre de HSC et d'avoir un haut niveau de reconstitution lorsque les cellules sont issues de la moelle ou des PBMC^{26,55}.

Bien que la souris immunodéficiente soit largement dépourvue de son système immunitaire inné et adaptatif, empêchant ainsi le rejet de la greffe de HSC, il restait néanmoins nécessaire de faire de la place dans les niches de la moelle osseuse de la souris avant de supporter l'installation et le développement des cellules humaines. Les souris immunodéficientes sont alors préconditionnées par une irradiation subléthale^{45,56,57}. Il a cependant été démontré que les cellules humaines sont capables de se greffer chez des souris jeunes adultes sans préconditionnement mais les lymphocytes T ne s'y développent alors que très partiellement⁵⁸. L'injection intrafémorale des HSC dans les NSG permet aussi une prise de

greffe même en l'absence d'irradiation mais le chimérisme observé est très bas⁵⁹. Plus récemment, des souris NSG et BRG porteuses d'une mutation sur la tyrosine kinase c-KIT⁶⁰ ont été décrites. Cette mutation empêche les HSC murines de se nicher dans la moelle et permet donc de ne pas avoir à irradier les souris avant la greffe. Ces souris démontrent une prise de greffe importante des HSC, incluant des cellules myéloïdes, des lymphocytes B et des cellules T intrathymiques⁶¹. Cependant, en l'absence de thymus humain, le développement de lymphocytes T en périphérie n'a pas été observé.

Des souris à des âges variés ont été utilisées, incluant des nouveau-nées, des jeunes de 3 à 4 semaines et des jeunes adultes de 6 semaines et plus. Pour la transplantation chez les nouveau-nés, plusieurs différentes voies d'injections ont été testées : par intraveineuse via la veine faciale ou la veine de la queue, via une injection intracardiaque, ou intrahépatique ou encore par voie intrapéritonéale⁶². À part par voie intrapéritonéale, ces voies d'injections ont toutes mené à une prise de greffe robuste des cellules humaines. Cependant, les injections chez les nouveau-nés sont toujours techniquement plus difficiles à réaliser.

L'utilisation de jeunes adultes de 6 semaines et plus permet une bonne reconstitution immunitaire après injection par voie intraveineuse via la veine de la queue, mais le développement du compartiment T est beaucoup plus pauvre. Les jeunes adultes peuvent aussi recevoir l'injection par voie intrafémorale. Plusieurs équipes utilisent aujourd'hui des souris âgées de 3 à 4 semaines car elles sont techniquement plus facile à injecter que des nouveau-nés et un bon développement des cellules T y est observé⁶³.

1.3.2 Les souris humanisées avec des PBMC

La transplantation de souris immunodéficientes avec du tissu ou des cellules humaines a été réalisée avec plusieurs sources: avec des PBMC, avec des cellules souches hématopoïétiques humaines purifiées ou encore avec du tissu fœtal humain (foie et thymus). L'utilisation des PBMC est l'approche la plus rapide et la plus simple sur l'aspect logistique pour humaniser une souris: les PBMC totaux peuvent être utilisés ou une population spécifique peut être purifiée avant injection. Les voies d'injections peuvent varier selon les objectifs de l'expérience, aujourd'hui les voies intraveineuses, l'injection intra-splénique sont les plus utilisées. Dans les souris NSG et les souris NOD, les cellules humaines se transplantent facilement et se multiplient

rapidement pour finalement obtenir une majorité de cellules d'origine humaine circulant dans le sang^{64,65}. Cependant, la population humaine prédominante qui se greffe est faite de cellules CD3⁺ activées tandis que les lymphocytes B et les cellules myéloïdes sont perdus quelques jours après la greffe. Ainsi, la majorité des cellules T greffées sont xénoréactives ce qui mène inévitablement à l'apparition d'une réaction du greffon contre l'hôte (GVHD) entre 3 et 6 semaines chez les NSG suivant l'injection.

Cette activation des cellules humaines peut être cependant bénéfique selon le contexte expérimental comme pour l'étude préclinique d'agents immunosuppresseurs humains, en plus de son utilisation pour l'étude approfondie de la GVHD et de sa prévention. Ainsi, ce modèle a donc été utilisé comme modèle préclinique pour l'étude d'immunosuppresseurs humain ou pour étudier l'immunorégulation de la réponse GVHD. Par exemple, une étude a montré que l'introduction de cellules souches mésenchymateuses humaines dans ces souris permettait de retarder le développement de la GVHD^{66,67}. Le modèle d'humanisation par des PBMC a aussi été utilisé pour investiguer la capacité des cellules dendritiques HLA-compatibles pour stimuler la réponse T ainsi que pour évaluer les stratégies vaccinales basées sur la fonction des cellules dendritiques. Cependant, la durée de vie très limitée de ce modèle empêche son utilisation pour l'étude à long terme de la fonction T, nécessitant le développement d'un système plus performant.

1.3.3 Les souris humanisées avec des HSC

Ainsi, la transplantation de cellules immatures ou de cellules souches dans des souris immunodéficientes pour permettre leur différenciation *in vivo* a donc ensuite développée.

Une reconstitution immunitaire de plusieurs lignées cellulaires a pu être établie en préconditionnant les souris NSG ou des BRG, par irradiation et en injectant des HSC humaines purifiés de sang de cordon, de foie fœtal, de sang périphérique adulte (après mobilisation) ou de moelle osseuse. Cela a résulté en la production d'une grande variété de cellules humaines, incluant des lymphocytes B et T, des monocytes, des macrophages, des cellules NK et des cellules dendritiques, qui sont présents dans de nombreux organes tels que le sang périphérique, la rate, les poumons, le foie, le cerveau, la moelle osseuse etc^{26,27,33}. Bien que les souris développent effectivement des granulocytes, des mégacaryocytes et des précurseurs de cellules

d'érythrocytes dans la moelle osseuse, ces cellules myéloïdes ne circulent pas en périphérie, probablement dû à l'absence de cytokines humaines requises pour le développement de ces cellules⁶⁸. Les cellules humaines qui se développent dans ce système ont été étudiées afin de les comparer fonctionnellement et phénotypiquement à leurs semblables se développant chez l'homme. Les cellules T générées dans ce modèle expriment un récepteur T porteur de la chaîne β avec une recombinaison V-J distribuée de manière égale dans le thymus et dans les tissus périphériques et exhibent un répertoire diversifié⁶⁹. De même, le répertoire d'anticorps dans ces souris semble avoir une diversification similaire à celle observée chez l'homme et montre des points de contrôle de la tolérance semblable à ce qui est observé chez l'homme.

Ainsi, des réponses de cellules T spécifiques à un antigène contre divers agents pathogènes humains ont été démontrées chez les souris humHSC, et on a observé une abrogation du contrôle immunitaire de l'infection par VIH-1 et EBV après l'épuisement des lymphocytes T CD8⁺^{70,71}. Cependant, les réponses spécifiques des cellules CD4⁺ et de CD8⁺ mesurées par la sécrétion de cytokines, la prolifération cellulaire ou les dosages cytotoxiques se sont révélées faibles. Par ailleurs, des déficiences dans les réponses des cellules T ont été rapportées par d'autres études^{42,72,73}. Plusieurs facteurs pourraient être responsables de ces réponses sous-optimales, notamment le faible niveau global de lymphocytes T, une survie médiocre en périphérie et des altérations fonctionnelles dues à une activation potentielle des lymphocytes T induite par la lymphopénie⁷⁴. Ainsi, la fonction des cellules T dans ces souris n'est que partielle, due principalement au fait que la maturation de ces cellules se passe dans le thymus murin.

L'analyse du répertoire d'anticorps chez les souris humHSC a montré que le répertoire des cellules B humaines était normal, n'indiquant donc pas de déficience évidente dans la génération d'anticorps. Par ailleurs, les réponses anticorps humains IgG et IgM antigène-spécifique dans ces souris ont été très bien documentées dans plusieurs rapports qui utilisaient soit des pathogènes vivants ou des antigènes purifiés. Cependant, les réponses IgG, qui restaient très sous-optimales dans plusieurs de ces études, ont été attribuées à un défaut de changement de classe efficace^{45,70,74,75}. Les cellules NK, quant à elles, semblent intactes mais elles requièrent une pré-activation pour être complètement compétentes. Par exemple, l'administration de complexes IL-15/récepteur IL-15 permet de stimuler la maturation fonctionnelle des cellules NK humaines.

Dans le compartiment myéloïde des souris humanisées, les neutrophiles humains, les basophiles, les mastocytes, les monocytes ainsi que les cellules dendritiques plasmacytoïdes peuvent être détectés et l'administration du facteur humain stimulant les colonies de granulocytes (G-CSF) mène aussi au recrutement d'un petit nombre de granulocytes humain dans le sang. La différenciation de la lignée myélomonocytaire semble réduite et les monocytes qui se développent sont phénotypiquement immatures. Cependant, les cellules dendritiques peuvent être stimulées avec de l'ARN double brin pour produire de l'interféron α (IFN α), suggérant donc qu'elles peuvent fonctionnellement répondre à une infection par un virus.

1.3.4. Le développement des lymphocytes dans le thymus murin

Ainsi, comme discuté plus haut, une reconstitution immunitaire humaine a pu être observée dans le sang périphérique de souris immunodéficiente suite à la greffe cellules souches hématopoïétiques humaines. Les HSC peuvent être purifiées à partir du sang de cordon, de la moelle osseuse ou du sang périphérique humain mais le tissu épithélial thymique utilisé pour la génération des lymphocytes T reste d'origine murine. En effet, les tissus lymphoïdes primaires et secondaires tels que le thymus et les ganglions lymphatiques sont essentiels pour permettre un développement complet du système immunitaire humain dans la souris⁷⁶.

Les cellules épithéliales du thymus humain qui expriment les complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I et II (MHCI ou MHCII) ont une affinité particulière pour les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ et jouent ainsi un rôle important dans la reconnaissance, la maturation et le développement des lymphocytes. La souris a aussi des cellules épithéliales thymiques exprimant les MHC murins tels que H-2K, H-2D, H-2L, I-A et I-E, qui affectent le développement des lymphocytes T^{77,78}. Comme ces molécules ne se présentent pas les mêmes séquences que les MHC humains, le thymus murin est fondamentalement limité pour jouer le rôle du thymus humain pour permettre une maturation normale des lymphocytes T. Les interactions lympho-stromales dans le thymus jouent un rôle pivot dans le développement et la maturation des lymphocytes T qui se basent sur l'expression du récepteur des cellules T (TCR) durant la sélection négative. L'environnement du thymus murin peut fournir partiellement certaines cytokines nécessaires au développement des cellules T. Cependant, cela ne suffit pas pour le développement complet et ainsi il en résulte des cellules partiellement fonctionnelles^{79,80}.

En effet, ces cellules sont souvent biaisées dans leur comportement, elles échouent à présenter avec succès le phénotype de cellules activées⁸¹.

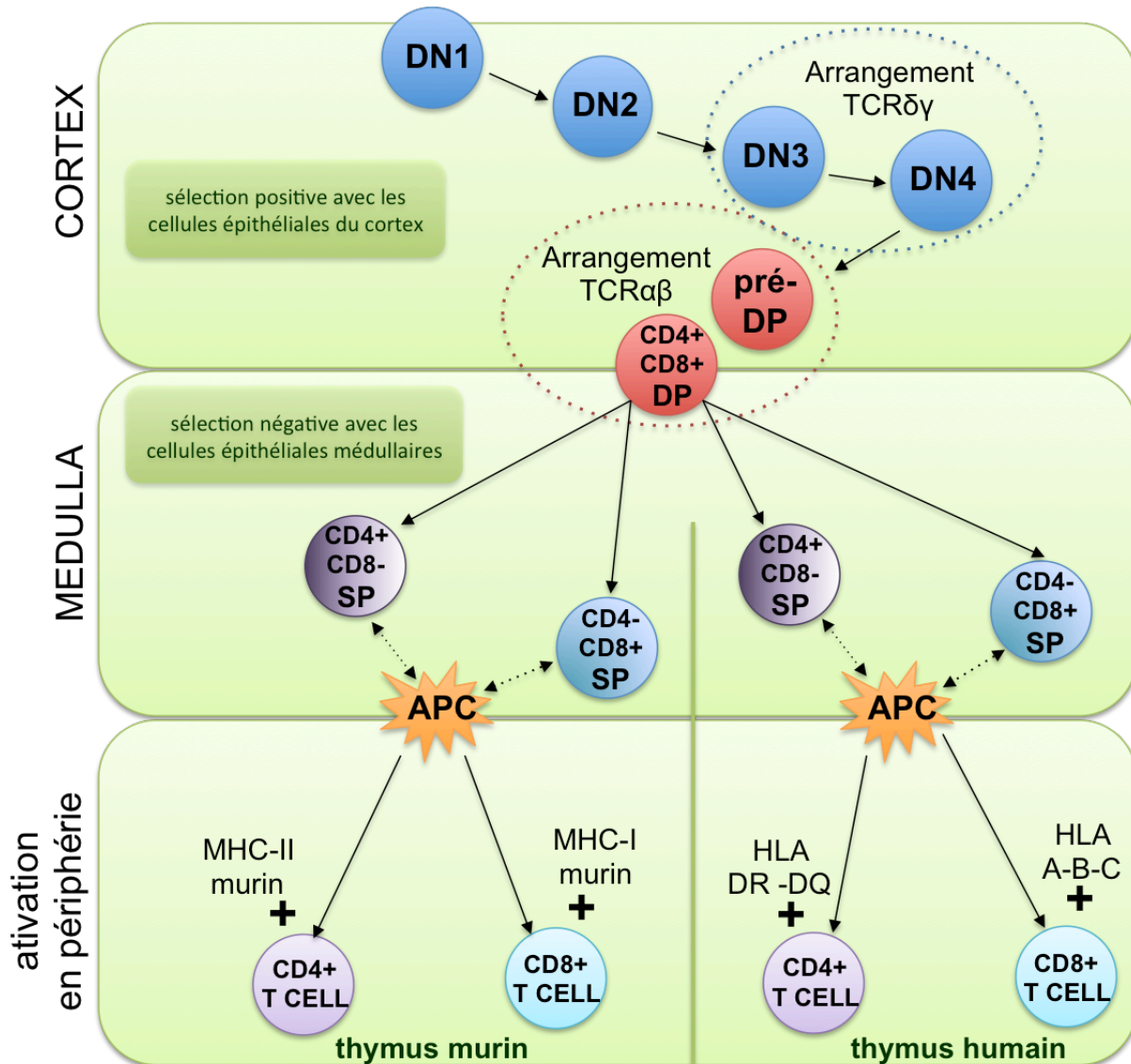


Figure 2. Les étapes de maturation des lymphocytes T dans le thymus

Adaptée et traduite de Lee, J. Y., Han, A.-R. & Lee, D. R. T Lymphocyte Development and Activation in Humanized Mouse Model. *Dev. Reprod.* 23, 79–92 (2019), autorisation de modifier et diffuser selon la licence Creative Commons Attribution Non-Commercial (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>)

Les HSC, qui ont la capacité de se différencier en plusieurs lignées cellulaires du système hématopoïétique, donnent naissance aux cellules T. Après la naissance, les HSC sont d'abord générées dans la moelle osseuse puis certains progéniteurs migrent, via le système sanguin, vers le thymus où commence le développement des T⁸². Le thymus est donc un organe lymphoïde primaire composé de cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques. Cet organe a une structure très organisée, avec les cellules épithéliales thymiques (TEC) corticales et les cellules TEC médullaires situés dans des régions distinctes⁸³. Les progéniteurs des cellules T dans le thymus sont appelés thymocytes, et vont passer par plusieurs phases de maturation⁸⁴. Les stades de développement des thymocytes sont associés à différentes localisations anatomiques dans le thymus⁸⁵. Les interactions entre les thymocytes et les TEC sont essentielles pour diriger ces stades de maturation. Les progéniteurs provenant de la moelle pénètrent dans le thymus au niveau de la jonction cortico-médullaire, se déplacent au travers du cortex puis de la médulla en passant par différentes étapes de prolifération, de différenciation, de réarrangement des gènes de récepteur cellulaire ainsi que d'une sélection positive et négative. Le degré de maturation des thymocytes peut être évalué par l'expression des marqueurs à sa surface. Les progéniteurs précoces des lymphocytes T dans le cortex du thymus sont définis comme double négatif (DN), car ils n'expriment ni le récepteur CD4 ni le récepteur CD8⁸⁶ (figure 2). Les cellules DN ayant un phénotype CD44⁺CD25⁺ peuvent ensuite se différencier dans le cortex en cellules double positive précoce (pré-DP) grâce à la sélection β du TCR⁸⁷. En effet, comme ces cellules sélectionnées ont réarrangé leur chaîne β du TCR de manière stable lui permettant ainsi d'être présentée à la surface du thymocyte, elles ont ainsi acquis le récepteur CD3 et expriment le récepteur CD4 et le récepteur CD8 en même temps⁸⁸. Les cellules non sélectionnées à cette étape sont programmées à mourir via apoptose. Les cellules qui ont survécu vont donc alors à leur tour réarranger la chaîne α de leur TCR pour produire un TCR- $\alpha\beta$ ^{89,90}. Les lymphocytes T exprimant un TCR complètement réarrangé et qui expriment à la fois CD4 et CD8 sont appelés doubles positifs (DP). Les cellules T DP sont alors capables d'interagir avec les molécules MHC et peuvent alors entrer dans le processus appelé sélection positive. Cette dernière sélectionne les cellules ayant un TCR capable de se lier aux molécules du MHC de classe I ou II avec au moins une faible affinité. Ceci élimine ainsi les lymphocytes T qui seraient non fonctionnels en raison d'une incapacité à se lier au MHC. Ainsi, les cellules DP vont être sélectionnées par le MHC de classe I ou de classe II. Elles vont ensuite devenir des cellules simples positives (SP) en inhibant

l'expression du récepteur CD4 ou CD8 pour lesquelles elles n'ont pas été sélectionnées. Les cellules SP passent ensuite par une sélection négative dans la médulla du thymus durant laquelle toutes les cellules T réagissant trop fortement au MHC du soi sont éliminées. Après cette sélection négative, les cellules SP acquièrent un phénotype naïf en exprimant le CD45RA et entrent dans la circulation périphérique⁹¹. Comme les lymphocytes T qui ont complété toute leur maturation dans le thymus ont aussi besoin de continuer une maturation fonctionnelle en périphérie en présence de HLA humain, la sélection négative dans le modèle de souris humanisées devrait donc être aussi réalisée uniquement avec des molécules HLA humaines. Cependant, le thymus murin n'exprime pas les molécules HLA, résultant ainsi en la maturation de lymphocytes T partiellement fonctionnels, qui, entre autres, ne sont pas capables de reconnaître un antigène humain dans un contexte HLA strict^{45,74}(figure 2).

Ainsi, malgré une prise de greffe satisfaisante dans la souris immunodéficiente NSG ou BRG, le développement et la différenciation en cellules immunitaires matures et fonctionnelles requièrent des interactions complexes entre cellules et par des facteurs solubles tels que des cytokines. Il est évident que dans un environnement murin, ces interactions ne sont pas toujours fonctionnelles et seulement quelques cytokines murines sont capables de réagir avec des récepteurs humains. C'est pourquoi on observe une reconstitution myéloïde et lymphoïde innée pauvre, ainsi qu'une déficience en cellules B matures (peu ou pas de cellules mémoires ou plasmatisques). Ces caractéristiques, en plus du fait de l'absence d'une niche thymique humaine appropriée pour la maturation des cellules T, mènent à un ratio lymphocytes B/T dans le sang beaucoup plus grand dans les souris humanisées que chez l'homme.

Traggia et al. ont par ailleurs montré que l'injection de HSC humaine provenant de cellules de cordons chez des nouveau-nés Rag2^{-/-}γc^{-/-} permet l'obtention d'un développement T amélioré dans le thymus murin³³. Une grande avancée dans ce modèle, comparé à celui utilisant des HSC venant de sang de cordon chez des souris adultes, est l'aptitude de la souris greffée à contrôler *in vivo* une réponse immune antivirale. Cependant, ce modèle nécessite une longue période (plus de 16 semaines) avant d'obtenir un niveau significatif de cellules T en périphérie et la population de cellules T dans la rate est faible. De plus, la restriction MHC et la tolérance de ces cellules humaines T qui ont été éduquées dans un thymus murin restent relativement peu étudiées.

1.3.5 Les souris Bone-Marrow/Liver/Thymus

En l'absence d'une structure thymique humaine permettant le développement et l'éducation des lymphocytes T dans un contexte HLA compatible, les souris humHSC ne permettent pas la reconstitution de cellules T humaines fonctionnelles. Ainsi, pour surmonter ce problème, une autre technique d'humanisation a été développée utilisant du tissu fœtal. Dans un premier temps, un morceau de foie fœtal humain a été co-greffé avec un morceau de thymus fœtal autologue sous la capsule rénale d'une souris SCID⁸. Cela a permis la production d'un nouvel organe vascularisé qui ressemblait structurellement et fonctionnellement à un thymus, permettant ainsi aux HSC présentes dans le foie fœtal de se différencier via la thymopoïèse entre CD4⁺CD8⁺ double positive puis en CD4⁺ ou CD8⁺ simple positive naïves. Cependant, la reconstitution systémique avec les cellules immunes humaines est extrêmement limitée dans ce modèle, avec seulement un très petit nombre de cellules humaines présentes en dehors de ce nouvel organe. Les réponses immunitaires adaptatives humaines, telles que la reconnaissance d'antigène ou la réponse humorale, ne sont aussi pas générées dans ce modèle⁸. Certaines de ces limites ont pu être surmontées en utilisant le modèle NSG comme souris immunodéficiente mais cela a produit une reconstitution systémique constituée quasiment exclusivement de lymphocyte T humains (pas de monocytes, macrophages, cellules dendritiques ou lymphocytes B).

Un modèle plus performant, appelé *Bone-Marrow/Liver/Thymus* (BLT), a alors été développé (figure 3). Dans ce modèle, la souris NSG reçoit un morceau de thymus fœtal humain sous la capsule rénale et une injection intraveineuse de HSC CD34⁺ purifiées depuis le foie fœtal autologue⁹². La création de ce modèle BLT sur un fond NSG permet l'obtention d'un système immunitaire robuste avec le développement d'un large panel de lignées cellulaires se développant.

Ainsi, en comparaison avec les humHSC, les réponses des cellules T semblent être qualitativement normales chez les souris BLT en raison de la présence d'un thymus humain autologue pour une éducation adéquate des cellules T, et l'émergence de populations T et B fonctionnelles⁹³⁻⁹⁵, permettant ainsi une restriction de HLA. D'ailleurs, des réponses antivirales spécifiques à l'épitope de manière restreinte de classe I ont été observées chez des souris BLT

infectées par le VIH-1⁹⁶. Concernant la population de lymphocytes B, les premières études ont montré que les réponses spécifiques des antigènes IgM et IgG présentaient une robustesse variée^{92,94}. Dans une étude plus récente, des immunisations de rappel répétées n'ont pas permis l'apparition de réponses secondaires caractérisées par la production d'IgG et l'abondance d'une population de cellules B de type *B-1 like* (CD19⁺CD5⁺) a été remarquée, contrairement à ce qui est observé chez l'homme⁹⁷. Il a ensuite été montré que de nombreux facteurs contribuent à cette réponse IgG inefficace tels qu'un manque d'aide adéquate de la part de la population des cellules T et l'absence de formation de centre germinaux optimaux^{74,98,99}.

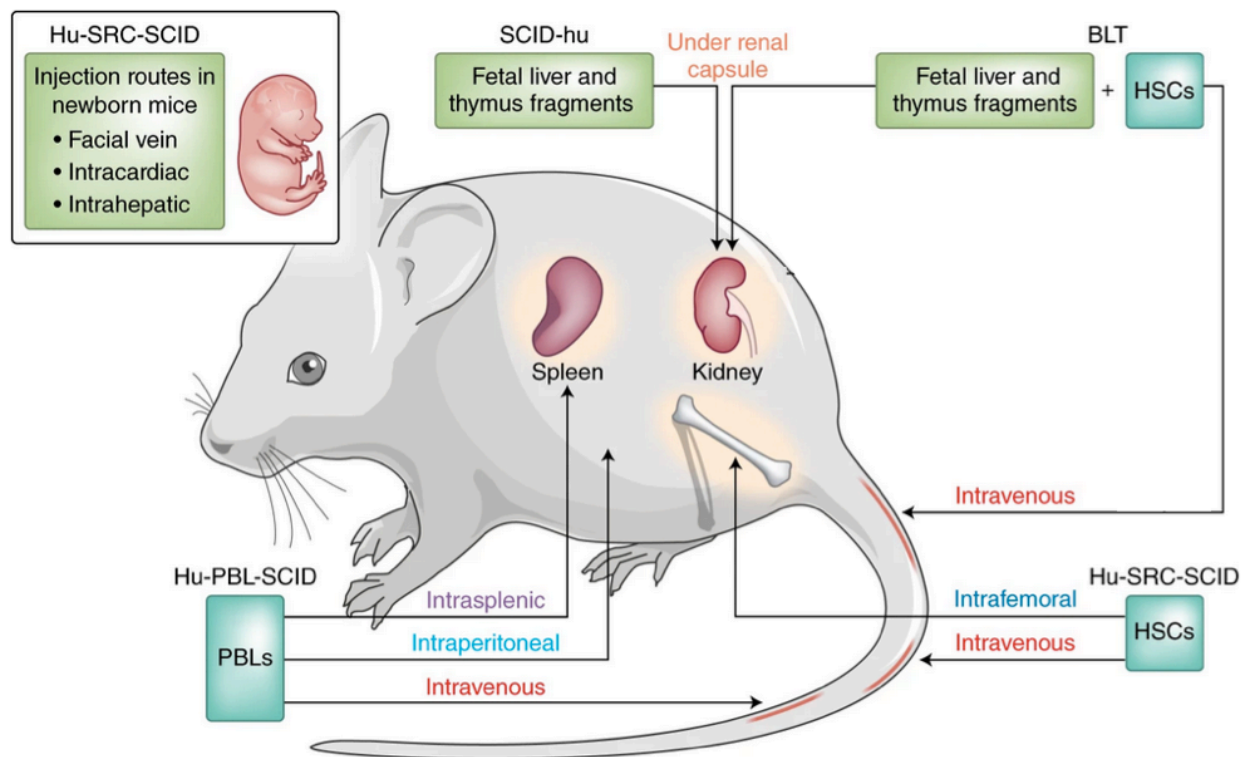


Figure 3. Les différentes techniques d'humanisation des souris immunodéficientes

Adaptée avec permission de Allen, T. M. et al. Humanized immune system mouse models: progress, challenges and opportunities. *Nat. Immunol.* **20**, 770–774 (2019), copyright © 2019 numéro de license 4678960710426

Ce modèle BLT est ainsi devenu le modèle le plus robuste pour les études précliniques de l'immunité humaine, de l'hématopoïèse, de la régénération des tissus, des cancers et des maladies infectieuses.

L'une des limites de ce modèle est l'apparition d'une GvHD à long terme qui peut réduire la fenêtre de temps donnée à l'expérience¹⁰⁰⁻¹⁰². De plus, les réponses humorales, entre autres, ne sont pas robustes, ce qui indique que des améliorations supplémentaires sont nécessaires pour toute étude future sur les vaccins par exemple. Par ailleurs, il faut également prendre en compte le fait que les réponses globales des cellules T observées chez les souris BLT ne sont pas entièrement limitées à celles du HLA humain en raison de la maturation de certains progéniteurs des cellules T dans le thymus murin natif préexistant et qui sont donc éduqués par le MHC murin.

I.4. L'optimisation des souris immunodéficientes

I.4.1. Limiter les effets de la GvHD

La raison de l'apparition de la GvHD est donc la xéno-réactivité des lymphocytes T qui est dirigée contre les molécules murines MHC de classe I et II. Pour contourner ce problème, des souches de souris immunodéficientes et qui n'ont plus ces molécules ont alors été développées. Récemment, des souris NOG déficientes en molécule de classe II (IA^{null}) ont ainsi été croisées avec des NOG déficientes en molécule de classe II ($B2M^{null}$) pour donner des souris NOG déficientes pour ces deux molécules. Ces souris n'ont pas ou peu montré de signes de GvHD lorsque greffées avec des PBMC. De plus, lorsqu'elles ont été immunisées avec le vaccin contre l'influenza, les souris ont été capables de développer des cellules B humaines spécifiques à l'antigène¹⁰³. Deux autres souches ont ensuite été développées utilisant les souches NSG : la $NSG-B2M^{null}(IA\ IE)^{null}$ et la $NSG-(K^bD^b)^{null}(IA^{null})$ ¹⁰⁴. Ces souris sont ainsi capables de développer des lymphocytes T matures qui sont capables de rejeter une allogreffe d'un îlot de cellules humaines sans observer de signe de GvHD. Par ailleurs, un nouveau modèle de souris BLT humanisées a été développé en utilisant le modèle de souris immunodéficientes $C57BL/6-Rag2^{null}IL2\gamma^{null}CD47^{-/-}$ TKO précédemment décrites⁵⁴. Ces souris TKO-BLT développent un système immunitaire périphérique robuste. De plus, il a été rapporté que ces souris ne développent pas de maladie semblable à la GVHD observée chez les souris NSG^{54,105}.

Ces modèles fournissent donc l'opportunité d'étudier plus profondément la fonction des cellules T matures dans des souris humanisées en l'absence des effets de la GvHD.

1.4.2. L'ajout des molécules HLA de classe I et II

Puisque les souris BLT nécessitent l'accès à des tissus fœtaux, qui n'est pas facile, une autre stratégie pour optimiser le développement des cellules T dans un environnement plus adéquat que le thymus murin a été envisagée. Shultz et al. ont ainsi développé des souris NSG-HLA-A2/HHD qui expriment les molécules HLA de classe I et qui sont capables de fournir une réponse cytotoxique des cellules T lors d'une infection par l'EBV dans un contexte HLA-A2 restreint. Cela prouve qu'il y a bien eu une éducation des cellules T via ces molécules HLA humaines¹⁰⁶. La différenciation des cellules T dans ces souris récapitule le développement observé chez l'homme *in vivo*. Ces souris *IL2 γ ^{null}* peuvent ainsi être greffées avec des HSC porteuses d'un HLA compatible pour permettre le développement de réponse des cellules T HLA-restreinte^{38,45,56,107-109}. Au lieu de l'ajout d'un HLA transgénique, des chercheurs ont plus récemment utilisé un vecteur AAV pour induire l'expression des molécules HLA de classe I (HLA-A2) dans des NSG greffées avec des HSC HLA-A2⁺¹¹⁰. Dans cette étude, des cellules T CD8⁺ reconnaissant un HLA restreint, ont été observées suivant une immunisation avec des antigènes du VIH ou de la malaria. Dans une autre étude, les vecteurs AAV ont été utilisés pour exprimer la molécule HLA de classe II (HLA-DR1 ou HLA-DR4) dans des souris greffées avec des cellules HSC compatibles pour les molécules HLA¹¹¹. Après une infection de ces souris avec le virus respiratoire syncytial (RSV), le virus a été plus rapidement éliminé par les souris NSG porteuses du HLA que celles sans et une production d'IFN γ par les cellules T reconnaissant spécifiquement le RSV a été observée. Par ailleurs, une meilleure réponse IgG a pu être obtenue dans ces souris transgéniques pour les molécules HLA de classe II transplantées avec des cellules HSC compatibles⁷⁷.

L'utilisation du vecteur AAV pour livrer la molécule HLA permet donc une expression rapide de cette molécule dans les souris immunodéficientes sans avoir besoin de créer de nouvelles souris transgéniques ou de faire des croisements, plus longs et fastidieux, pour finalement obtenir l'expression de la molécule HLA. Cependant, ces souris sont plus difficiles à mettre en place puisque la compatibilité est nécessaire entre les molécules HLA utilisées chez les souris avec les HSC injectés, ce qui réduit ainsi la fenêtre d'étude à un certain type de population.

1.4.3. Les souris SGM3

La mise au point de modèles murins humanisés de plus en plus performants est donc toujours en cours. Récemment, Mulloy et al. se sont intéressés à la faible prise de greffe de cellules leucémiques myéloïdes aiguës (AML) humaines chez les souris humanisées¹¹². Les raisons de cette faible prise restent toujours peu claires aujourd'hui, cela pouvant inclure un défaut dans le signal de *homing*, l'absence de facteurs de croissance humaine, la survie dans une niche étrangère, etc. L'utilisation de souris immunodéficientes telle que la NSG a permis de contourner certains de ces obstacles, le problème majeur restant étant alors l'absence de cytokines et facteurs de croissance humaine¹¹³⁻¹¹⁵. C'est pourquoi ils ont mis au point un nouveau modèle sur un fond génétique NSG qui contient en plus trois transgènes permettant l'expression constitutionnelle d'IL-3 humaine, de GM-CSF humain, et de SCF humain. Ce nouveau modèle, appelé NSG-SGM3, a ainsi permis une meilleure prise de greffe de l'AML^{112,113}. Lorsqu'injectées avec des HSC humaines CD34⁺, ces souris ont mis en évidence un bien meilleur développement de cellules myéloïdes^{116,117}, tels que les monocytes et les neutrophiles, mais aussi de cellules T régulateurs CD4⁺FoxP3⁺¹¹⁸. Plus récemment, une nouvelle étude a permis de montrer que les mastocytes humains présents dans des souris NSG-BLT SGM3 sont fonctionnels et actifs puisqu'ils sont capables de reproduire aussi bien une réaction d'anaphylaxie passive cutanée ou systémique¹¹⁹.

Cette amélioration de la NSG, par l'expression de cytokines et facteurs de croissances humaines, est donc prometteuse pour permettre le développement de nouvelles souris humanisées qui reproduiront au mieux le développement et le fonctionnement du système immunitaire humain.

1.4.4. Les souris MITRG et MISTRG

Afin d'optimiser le développement et la fonction du compartiment myéloïde et des cellules NK dûs au manque de réactions croisées des cytokines murins, un autre modèle d'humanisation génétique de la souris immunodéficiente a été proposé. Le laboratoire de Richard Flavell a ainsi créé les souris appelées MITRG et MISTRG à partir de souris Balb/c Rag2^{-/-} et Il2rg^{-/-} qui exprime les molécules humaines M-CSF, IL-3, GM-CSF et la

thrombopoïétine (TPO) ainsi que le SIRP- α (dans le cas de la MISTRG)¹²⁰. Ces modèles, spécialement la MISTRG, supportent un fort développement de cellules myéloïdes monocytaires et montre une forte réponse immune innée humaine lors d'infections par des virus ou des bactéries¹²⁰. De plus, le nombre croissant de monocytes et de cellules dendritiques (DC) mène à une trans-présentation plus efficace de l'IL-15 résultant en une multiplication par 10 du nombre de cellules NK présentes¹²⁰. Les souris MISTRG soutiennent ainsi le développement de monocytes fonctionnels caractérisés par la production de *tumor necrosis factor- α* TNF- α et d'IL-6 en réponse à une stimulation par des lipopolysaccharides ou des agents pathogènes, ainsi qu'une activité phagocytaire contre *E. coli*¹²⁰.

Cependant, ces résultats prometteurs sont contrebalancés par un fort taux de mortalité précoce de ces souris causé par une anémie sévère due à une érythropoïèse murine faible et une érythrophagocytose des érythrocytes murins par les macrophages humains.

1.5. Les souris humanisées comme modèle préclinique de maladies humaines

Ces modèles avancés de souris humanisées sont aujourd'hui très importants dans l'étude de nombreuses réponses biologiques et des maladies chez l'homme. Ils sont par ailleurs de plus en plus utilisés comme outils précliniques pour comprendre et évaluer l'efficacité des médicaments mais aussi pour identifier les mécanismes sous-jacents d'une vaste gamme de maladies. En particulier, les souris humanisées jouent un rôle majeur dans l'étude d'agents infectieux spécifiques à l'homme, tels que le VIH, et sont largement employées comme modèles précliniques en biologie du cancer. De plus, les souris humanisées sont de plus en plus présentes dans des études permettant l'amélioration des connaissances dans de nombreux autres domaines de la recherche biomédicale, y compris la médecine régénérative, la transplantation et l'immunité.

1.5.1. Les souris humanisées et les tumeurs

Les thérapies conçues pour induire ou améliorer la réponse immunitaire contre les tumeurs constituent une stratégie attrayante pour contrôler l'évolution tumorale et font l'objet de recherches approfondies. Cependant, plusieurs cas d'effets secondaires ou de résultats cliniques décevants ont ralenti le développement de nouvelles immunothérapies. Une meilleure

compréhension de l'hétérogénéité de la tumeur, des mécanismes de la réponse immunitaire et de l'interaction avec le microenvironnement de la tumeur est une étape indispensable pour la mise au point de traitements sûrs et efficaces.

Ainsi, depuis plus d'un demi-siècle, la xénogreffe de tumeurs dérivées de patients chez des souris *nude* athymiques et, plus récemment, chez des souris immunodéficientes génétiquement modifiées a permis aux chercheurs d'améliorer les traitements de nombreux cancers humains. Malheureusement, comme expliqué précédemment, les souris athymiques conservent des cellules B murines ainsi qu'un système immunitaire inné, en particulier les cellules NK, qui peuvent nuire à la croissance tumorale et à l'apparition de métastase. En revanche, les souris immunodéficientes IL2rg^{-/-} sont dépourvues de cellules NK et présentent des déficiences immunitaires innées supplémentaires. Elles sont donc capables de supporter la greffe de différentes tumeurs humaines incluant les lignées cellulaires tumorales, les tumeurs solides primaires humaines et les tumeurs hématologiques. Il y a ainsi aujourd'hui trois moyens d'étudier la croissance des tumeurs et l'immunologie du cancer chez les souris humanisées.

Dans un premier temps, les lignées cellulaires tumorales peuvent être greffées dans des souris déjà reconstituées avec des HSC ou des PBMC^{64,121,122}. Par exemple, le cancer du sein a été modélisé dans les souris en injectant soit des HSC et des cellules tumorales dans des souris nouveau-nées, soit des PBMC et des cellules tumorales dans des souris BRG¹²¹. Dans ces modèles, les cellules immunitaires ont été capables de circuler et d'infiltrer le microenvironnement, permettant ainsi l'étude des interactions entre la tumeur et le système immunitaire humain. Afin de mieux comprendre les réponses immunitaires lors de l'injection de lignées cellulaires tumorales, les souris MISTRG ont été développées et humanisées avec des HSC issues de foie fœtal humain et ensuite transplantées avec la lignée cellulaire du mélanome Me290¹²⁰. Similairement à ce qui a été observé en clinique, des cellules myéloïdes ont été capables d'infiltrer la tumeur ainsi que des cellules exprimant des marqueurs communément associés aux macrophages. L'hypothèse de cette étude était que la croissance de la tumeur pourrait être contrôlée par les macrophages *M2-like* qui peuvent induire la production de cytokines ou d'enzymes qui promeuvent la vascularisation et la suppression immunitaire. Ainsi, les souris ont été traitées avec un inhibiteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). Les souris transplantées avec les cellules Me290 ont répondu au traitement en inhibant

la croissance de la tumeur, suggérant donc que les cellules myéloïdes peuvent favoriser la croissance tumorale via l'activité de VEGF.

Les souris immunodéficientes peuvent aussi recevoir des tumeurs primaires par une xénogreffe dérivée du patient (PDX)^{43,123,124}. Par exemple, des souris nouveau-nées NSG transplantées avec une leucémie myéloïde aigue (AML) dérivée d'un patient ont résulté à un haut taux de prise de greffe dans le sang périphérique, la rate et la moelle osseuse de ces souris⁴³. Ces souris ont développé une splénomégalie et une infiltration de la leucémie dans de multiples organes, comparable à ce qui est observé chez les patients. Bien que l'hétérogénéité moléculaire de l'AML reste inchangée lors de la mise en place de transplantations en série, de nombreuses études portant sur des PDX greffées chez des souris immunodéficientes ont montré que cette hétérogénéité de la tumeur parentale n'était souvent maintenue que dans la greffe primaire¹²⁵. Au fil du temps et des passages en série de la tumeur, le stroma humain a souvent été compromis par l'infiltration et le remplacement de cellules dérivées de souris^{46,125}. Ce modèle est donc idéal pour comprendre les interactions entre le stroma et les tumeurs, qui sont essentielles à la croissance tumorale et constituent une cible importante du traitement du cancer.

Enfin, pour une étude plus approfondie des interactions entre les cellules immunitaires humaines et la tumeur *in vivo*, les souris immunodéficientes peuvent être greffées avec des PDX et des cellules immunitaires humaines^{126,127}. Ce modèle PDX humanisé a non seulement un microenvironnement tumoral complet, mais également une capacité à exprimer l'hétérogénéité de la greffe primaire perdue lors de transplantations en série. Cependant, l'un des inconvénients de ce modèle est la difficulté à obtenir des HSC autologues, qui affecte ainsi la capacité à générer des cohortes de souris pour la recherche.

Bien que ces modèles de souris immunodéficientes permettent le développement de la plupart des lignées de cellules tumorales, toutes les tumeurs primaires, comme le cancer de la prostate, ne sont pas facilement greffables¹²⁷. De nouveaux modèles de souris humanisées sont donc nécessaires afin de mieux comprendre les interactions entre le système immunitaire et la tumeur, les mécanismes d'évasion tumorale, ainsi que pour permettre le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques telles que les immunothérapies, la chimiothérapie, la thérapie par cellules NK, les inhibiteurs de point de contrôle et le traitement par cytokines.

1.5.2. Les souris humanisées et les maladies infectieuses

Une des utilisations principales du modèle des souris humanisées ces dernières années a été pour les études des agents infectieux humains. En effet, les souris humanisées offrent l'occasion d'étudier des agents pathogènes spécifiques à l'espèce humaine qui nécessitent la présence d'un environnement ou protéines humaines et qui sont ainsi sans aucun effet chez les autres espèces, telle que la souris. L'implantation de cellules immunitaires humaines dans des souris immunodéficientes permet donc le développement d'infection par ces pathogènes spécifiques et ainsi de mieux en étudier les mécanismes immunitaires concernés et leur traitements. Les différences entre les souches de souris immunodéficientes disponibles et les méthodes de prise de greffe font que le choix optimal du modèle animal dépend de la question posée et de l'agent pathogène concerné. Une liste non exhaustive de plusieurs études réalisées sur des agents spécifiques à l'homme est dressée dans le tableau suivant (Tableau II).

Tableau II. Les agents infectieux étudiés chez les souris humanisées

Adapté et traduit de Arch Immunol Ther Exp février 2018 doi: 10.1007/s00005-018-0506-x autorisation de modifier et diffuser selon la licence Creative Commons Attribution 4.0 International

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Agent infectieux	Souche immunodéficiente	Greffe	références
EBV	NOG	HSC	128-130
	NSG HLA-A2 ⁺ /B2M ^{-/-}		106,130,131
Virus Ebola	NSG	PBMC	132
	NSG-SGM3	HSC	133
	NSG	BLT	134
Virus de la Dengue	NSG	HSC	135,136
	NSG HLA-A2 ⁺ /B2M ^{-/-}	HSC, BLT	137
	BRG	HSC	138
Hépatite C	BRG	HSC et hépatocytes foëtaux	139,140

Virus humain T lymphotropique 1	BRG	HSC	¹⁴¹
Cytomégalo virus	NSG	HSC	¹⁴²
<i>Borrelia hermsii</i>	NSG	HSC	¹⁴³
<i>Salmonella enteric</i>	NSG	HSC	¹⁴⁴
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	NSG	BLT	¹⁴⁵

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) de type 1 est un virus spécifique à l'homme. Le modèle SIV / macaques est largement utilisé pour la recherche sur le VIH-1 depuis le milieu des années 1980 et a fourni des informations essentielles sur la transmission, la pathogenèse, le traitement, la latence, le microbicide et le vaccin du VIH-1. Cependant, les macaques sont génétiquement distincts des humains, en particulier pour les molécules MHC de classe I et le TCR, et ne sont pas susceptibles à une infection par le VIH-1. Ainsi, les résultats dérivés de ce modèle peuvent ne pas être directement utilisés dans des essais cliniques sur l'homme. Par exemple, les vaccins conçus et testés dans ce modèle à l'aide de SIV doivent être repensés pour pouvoir être testés dans des essais cliniques humains. La nouvelle génération de souris humHSC et BLT offrait donc une nouvelle occasion d'étudier l'infection à VIH-1 directement. L'absence d'un modèle de petit animal pour des études *in vivo* ayant sérieusement entravé la recherche sur le VIH, les souris humanisées représentent donc des outils performants pour l'étude du VIH et de son interaction avec le système immunitaire humain.

II. Le virus de l'immunodéficience humaine

Les décès reliés au syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) ont été estimés à environ 32 millions depuis le début de l'épidémie (UNAIDS 2019). En 2018, 1,7 millions de personnes ont été nouvellement infectées par le VIH et environ 37,9 millions de personnes vivaient avec cette maladie, principalement dans les pays en voie de développement (UNAIDS 2019). Bien que la thérapie antirétrovirale (ART, antiretroviral therapy) ait considérablement augmenté le taux de survie et la qualité de vie des personnes infectées, seulement 23,3 millions de personnes infectées y ont accès, laissant près de 40% des malades non traités (UNAIDS 2019). Grâce à l'initiative et la prise de conscience de plus en plus importante de la population mondiale, un nombre croissant de personnes infectées par le VIH ont accès à la thérapie antirétrovirale mais ces efforts sont malheureusement freinés entre autres par la difficulté d'accès aux soins, le prix et la toxicité du traitement. Malgré des progrès considérables fournis par la recherche aux cours des dernières décennies, la découverte de thérapies préventives ou plus efficaces est toujours attendue.

II.1. Origine et structure du VIH

Le SIDA a d'abord été diagnostiqué en 1980¹⁴⁶, mais l'origine de ce syndrome, le VIH, n'a été identifiée qu'en 1983 à l'Institut Pasteur de Paris, où des chercheurs ont isolé le rétrovirus à partir de la glande lymphatique d'un patient souffrant du SIDA¹⁴⁷. Depuis sa découverte, la virologie du VIH a été rigoureusement étudiée avec l'espoir de développer une thérapie efficace.

Le VIH est du genre lentivirus de la famille des *Retroviridae*, caractérisé par une période d'incubation longue entraînant une évolution lente de la maladie. Le VIH a ensuite été catégorisé en deux types VIH-1 et VIH-2, en se basant sur des variabilités génétiques. Le VIH-1, dont l'origine se situe dans l'Afrique centrale et l'Afrique de l'Est, et le VIH-2 de l'Afrique de l'Ouest, étaient tous deux importants dans les débuts de l'épidémie, mais aujourd'hui la pandémie est principalement due au VIH-1¹⁴⁸.

Le VIH-1 est un virus enveloppé avec une matrice de protéine qui protège une structure nucléoïde au centre de la particule virale. Cette structure contient un génome fait d'ARN

dimérique viral entouré d'une nucléocapside, elle-même protégée par une capsid virale¹⁴⁹ (figure 4). Cette structure nucléoïde contient aussi des intégrases virales, des transcriptases inverses et des protéases. Le virion est entouré d'une enveloppe dérivée de constituants de l'hôte qui est formée de plusieurs glycoprotéines responsables de l'attachement et de la fusion du virion avec les cellules de l'hôte¹⁵⁰. Chaque glycoprotéine est composée de trois sous-unités transmembranaires gp41 (trimère) et un trimère gp120 qui se lient aux récepteurs CD4 et aux co-récepteurs CXCR4 et CXCR5 des cellules de l'hôte¹⁵¹ (figure 4).

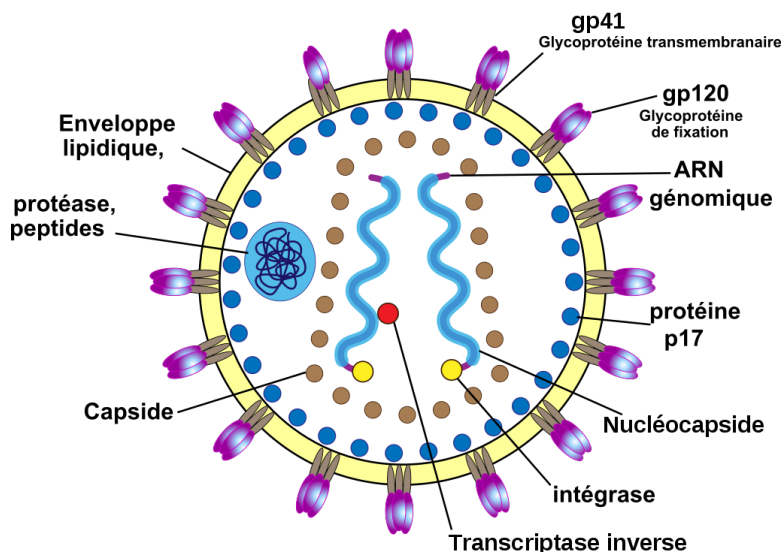


Figure 4. La structure et la composition du VIH

Permission de partage selon la licence Cc-by-SA-3.0-migrated, GFDL

<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/legalcode>

Le génome VIH fait approximativement 9 kilobases (kb) de long et code pour 10 gènes: les gènes régulateurs tat et rev; les gènes accessoires vpu, vpr, vif et nef et les gènes structuraux gag, pro, pol, env. Il contient aussi des séquences non codantes, incluant deux séquences terminales longues répétées (LTR)¹⁵². Parmi les régions codantes, le gène régulateur rev code pour une protéine qui transporte des transcrits d'ARN épissés du noyau de la cellule vers le cytoplasme pour permettre la traduction et l'encapsidation tandis que tat code pour un facteur de transcription qui régule l'expression de l'ADN VIH. Les gènes accessoires vpu, vpr, vif et nef

codent pour des protéines qui semblent inhiber les défenses cellulaires contre les rétrovirus. Gag et env, quant à eux, codent pour des protéines qui servent respectivement à la structure nucléoïde ou à l'enveloppe. Enfin, pol code pour des enzymes nécessaires à la transcription inverse de l'ARN viral en ADN ainsi qu'à la maturation et à l'intégration de l'ADN viral dans le génome de l'hôte¹⁵³.

II.2. Le cycle de réplication du VIH

Comprendre le processus de la réplication du VIH a joué un rôle clé pour trouver des molécules qui la contrôlaient et permettre ainsi de développer un traitement pouvant bloquer différentes étapes de ce cycle de réplication.

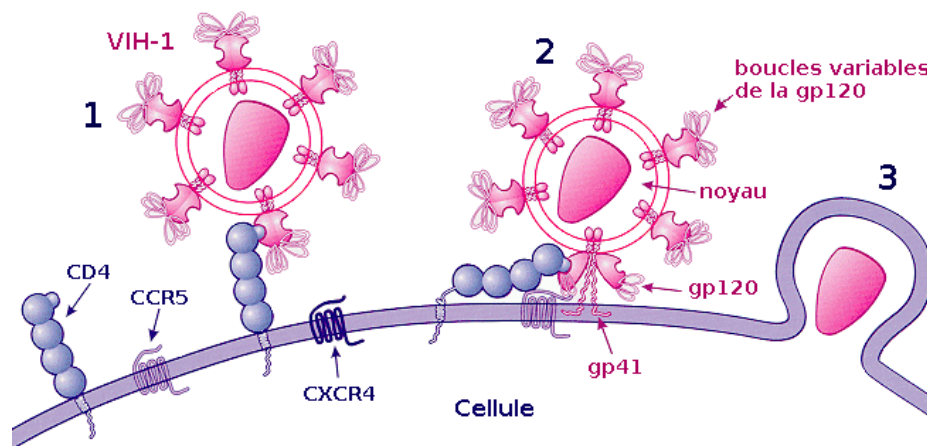


Figure 5. Les mécanismes d'entrée du VIH dans la cellule hôte

Libre de droit - Adaptée et traduite de <http://www.niaid.nih.gov>

L'infection par le VIH commence par la liaison du gp120 aux récepteurs CD4 de l'hôte^{154,155} (figure 5). Le récepteur CD4 est exprimé à la surface des lymphocytes T helper (Th), des monocytes, des macrophages et des cellules dendritiques. Après la liaison, le gp120 change de conformation¹⁵⁶, permettant ainsi des interactions avec les co-récepteurs CXCR4 et CCR5¹⁵⁷ (figure 5). Ces interactions vont amener le virus encore plus à proximité de la cellule et

permettent ainsi la fusion avec la cellule grâce à la protéine de fusion gp41¹⁵⁸. La fusion entre le virus et la membrane de l'hôte va permettre l'entrée de la capside virale dans la cellule¹⁵⁹. Le VIH peut aussi entrer dans la cellule via une route alternative telle que la phagocytose, une entrée contrôlée par les anticorps ou par la transmission de cellules à cellules. Cependant, ces routes alternatives ne mènent pas toujours à une infection productive.

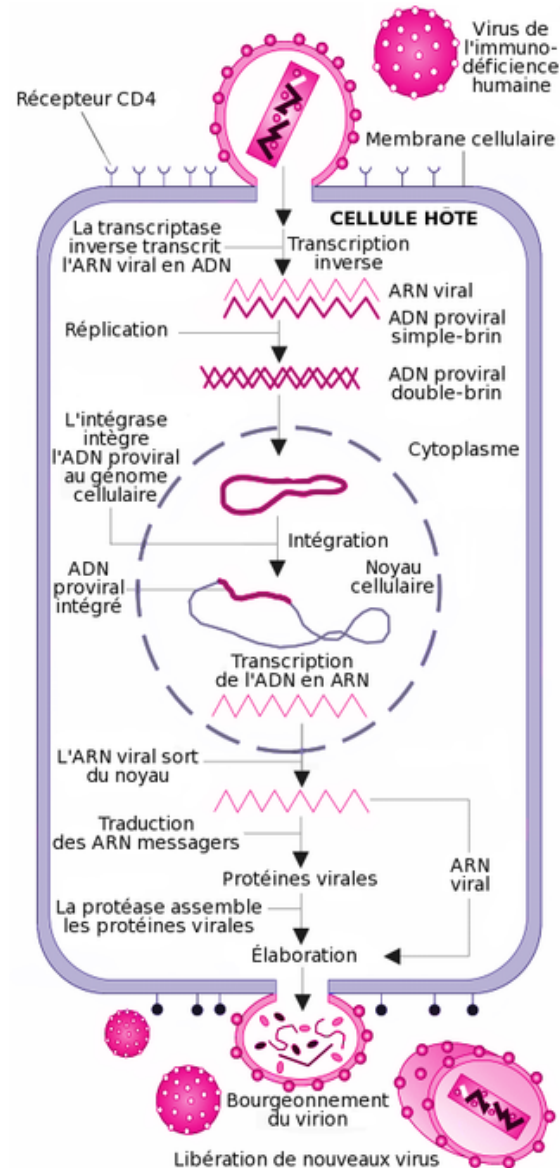


Figure 6. Le cycle de réplication du VIH dans la cellule hôte

Permission de partage selon la licence Cc-by-SA-3.0-migrated, GFDL

<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/legalcode>

Une fois le VIH entré dans la cellule, la transcriptase inverse copie l'ARN viral en un ADN complémentaire. Simultanément à cette étape, le virus perd sa capside, afin de permettre son entrée dans le noyau de la cellule hôte. Les transcriptases inverses, grâce à leur activité d'ADN polymérase, génèrent aussi un second brin d'ADN complémentaire viral¹⁶⁰ (figure 6). Cet ADN double brin est ensuite transporté dans le noyau de la cellule où il va être intégré dans l'ADN de l'hôte grâce à la formation d'un complexe de nucléoprotéines de préintégration fait de matériel génétique viral ainsi que de protéines du virus et de l'hôte. Cet ADN intégré est appelé ADN pro-viral et peut rester en dormance pendant une longue période. Sous un signal activateur, cet ADN pro-viral est transcrit en un ARN messager (ARNm) par l'ARN polymérase II de l'hôte. Cet ARNm primaire contient de multiples introns et peut générer plus de 30 ARNm alternatifs grâce à différents degrés d'épissage^{161,162}. L'ARNm doublement épissé peut être traduit en les principales protéines régulatrices, particulièrement Nef, Tat et Rev¹⁶³; l'ARNm partiellement épissé suffit à exprimer les précurseurs de Env (gp160), Vif, Vpu et Vpr¹⁶⁴ et enfin l'ARNm non épissé peut générer les précurseurs des protéines de Gag et Gag-Pol¹⁶⁵.

La gp120 et la gp41^{166,167} sont ensuite générées par un clivage du précurseur gp160 par une endoprotéase avant d'être transportées à la membrane plasmique de la cellule. Les deux nouveaux ARN viraux sont aussi transportés à la membrane plasmique avec les précurseurs des protéines Gag et Gag-Pol. L'assemblage et l'empaquetage du virion se fait grâce à un bourgeonnement à la surface de la membrane plasmique de la cellule hôte. Pendant ce processus, les précurseurs des protéines Gag et Gag-Pol sont clivés, ce qui aboutit à la version mature du virion¹⁶⁸ (figure 6).

Pour toutes ces étapes du cycle de la réplication du virus, le VIH va utiliser la machinerie cellulaire de l'hôte. Chacune de ces étapes sont par ailleurs ciblées par des facteurs de restrictions spécifiques afin de tenter de limiter la multiplication virale¹⁶⁹⁻¹⁷².

II.3. L'infection par le VIH

Les avancées technologiques en matière de clonage moléculaire ont permis de mieux comprendre et étudier la nature et l'origine de la transmission du VIH, dans les jours suivant l'infection.

La transmission sexuelle du virus par voie mucosale est la principale route d'infection du VIH¹⁷³. Dans à peu près 80% des cas d'infection par cette voie, une seule particule du VIH-1 est suffisante pour traverser la barrière mucosale et créer une infection productive¹⁷⁴. Dans les deux semaines suivant l'infection, le virus traverse la barrière épithéliale mucosale, infecte une petite population de lymphocytes T CD4⁺ et se multiplie localement en infectant d'autres lymphocytes T CD4⁺ environnants activés ou au repos¹⁷⁵. En ayant infecté cette petite population de cellules, le virus est ainsi transporté dans le réseau lymphatique aux ganglions lymphatiques proches qui contiennent un plus large nombre de cellules cibles, permettant l'accès par la suite au système sanguin et la dissémination dans les organes lymphoïdes secondaires. Entre 21 et 28 jours après l'infection, la charge virale atteint un pic avec plusieurs millions de copies virales détectables dans le plasma du patient (figure 7). À ce stade, appelé la phase aiguë, l'infection par le VIH est irréversiblement établie et un large nombre de cellules T CD4⁺ ont été supprimées¹⁷⁶.

La détection précoce de cellules T CD8⁺ répondant spécifiquement au VIH-1 coïncide avec le moment où la charge virale commence à diminuer. Chaque hôte infecté atteint un certain niveau de charge virale, qui corrèle avec le taux de progression de la maladie : les individus ayant une charge virale maximale plus faible semblent avoir un meilleur pronostic de progression de la maladie¹⁷⁷. La latence du virus peut durer entre plusieurs années jusqu'à plusieurs décennies grâce au succès de l'utilisation du traitement antirétroviral. Ce stade latent est accompagné d'une charge virale stable et d'une diminution lente du nombre de lymphocytes T CD4⁺ (figure 7). La perte graduelle de ces cellules amène au stade tardif de la maladie caractérisé par un compte de lymphocytes T CD4⁺ inférieur à 200 cellules/mm³. Un niveau si bas de lymphocytes T CD4⁺ rend ainsi la personne infectée susceptible à n'importe quelles infections opportunistes¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. Le nombre de lymphocytes T CD4⁺ continue de diminuer drastiquement durant cette phase avancée et la charge virale augmente à nouveau au moins au même niveau que celui atteint lors de la phase aiguë (figure 7). En plus d'infections opportunistes et de problèmes directement reliés au VIH, des tumeurs malignes dues au SIDA, telles qu'un sarcome de Kaposi ou un lymphome Non-Hodgkin peuvent aussi contribuer à la mort des patients infectés¹⁸¹.

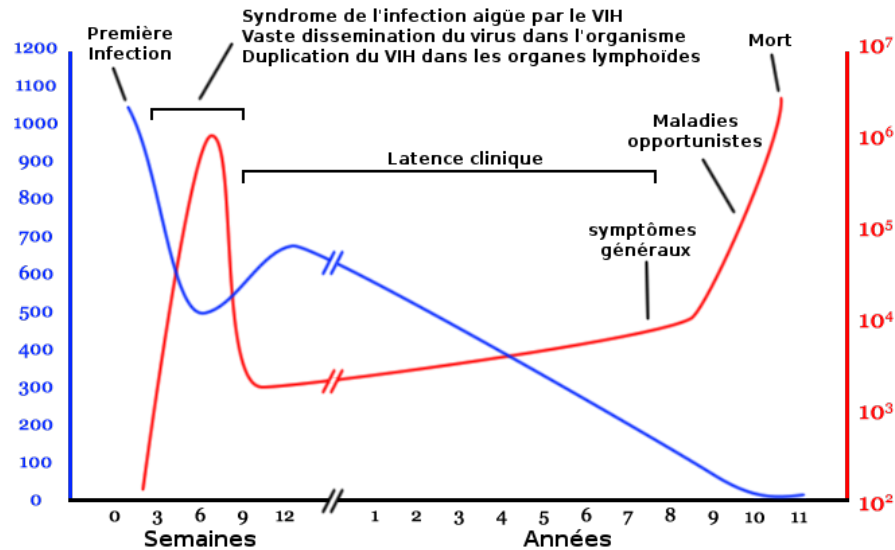


Figure 7. Évolution du compte de lymphocytes CD4+ (bleu) et de la charge virale (rouge) au cours du temps suivant l'infection d'un individu par le VIH

Permission de partage selon la licence Cc-by-SA-3.0-migrated, GFDL

<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/legalcode>

II.4. Les facteurs influençant l'infection par le VIH

En l'absence d'un traitement antiviral, le système immunitaire de la majorité des individus infectés par le VIH n'agit plus efficacement, permettant le développement d'infections opportunistes et le patient décède donc des conséquences du SIDA. Malgré des décennies de recherche sur ce virus, aucune thérapie prophylactique ou stratégie vaccinale n'a démontré une efficacité satisfaisante jusqu'à maintenant^{182,183}. Plusieurs études ont permis d'identifier des facteurs viraux ou chez l'hôte qui sont associés à une progression plus rapide ou inversement plus retardé du SIDA.^{172,184-189} Comprendre ces facteurs, qui incluent entre autres le type HLA, les récepteurs à chimiokines ou des facteurs de restrictions chez l'hôte, pourra aider dans le futur à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour empêcher ou guérir l'infection au VIH.

Un facteur génétique connu associé à une progression très ralentie de la maladie est la mutation $\Delta 32$ CCR5, une délétion de 32 paires de base dans le gène codant pour le co-récepteur

du VIH-1 CCR5. Les individus homozygotes pour cette délétion n'expriment pas le CCR5 à la surface des cellules et sont donc plus résistants à l'infection au VIH^{190,191}.

Un sous-ensemble de la population infectée par le VIH est capable de montrer un contrôle spontané du cycle de réplication du virus en l'absence de traitement antirétroviral¹⁹². Décrits à l'origine comme des individus maintenant un compte de cellules CD4⁺ supérieur à 500 cellules/mm³ sans thérapie antirétrovirale, ils peuvent rester sains pendant de longues années. Certains peuvent cependant commencer à développer des signes cliniques seulement après 10 à 15 ans suivant l'infection¹⁹³. De ce sous-groupe a émergé un autre groupe appelé les *elite controllers* (EC). Représentant moins de 1% des patients infectés par le VIH-1, les ECs sont capables de contrôler la réplication du virus à un niveau inférieur au seuil de détection (< 50 copies/mL) pendant parfois plus de 25 ans¹⁹⁴. La caractéristique la plus communément retrouvée pour ces patients contrôlant le VIH-1 est l'expression de certaines classes HLA¹⁹⁵. Ainsi, les HLA-B*13, le B*27, le B*51, le B*57 et le B*5801 sont souvent retrouvées dans les cohortes de patients VIH-1 dont la maladie ne progresse pas^{189,195-197}. Ces individus fournissent une preuve de principe qu'une immunité naturelle contre le VIH-1 existe et peut protéger contre la progression de la maladie. De nombreuses études sont encore aujourd'hui en cours sur ces différents groupes de patients pour mieux comprendre la réponse immunitaire qui permet cette protection long-terme et ainsi permettre éventuellement un jour la découverte de marqueurs candidats pour une stratégie vaccinale contre le VIH.

II.5. Les réponses immunitaires induites lors de l'infection par le VIH

Les réponses immunitaires contrôlées par différents types cellulaires sont des composantes critiques de la défense de l'hôte contre la réplication du VIH-1. Ainsi, comprendre l'impact des cellules NK et la fonction effectrice des lymphocytes T et B lors de l'infection par le VIH-1 est primordiale pour définir les corrélations entre une protection long terme contre le virus et le développement de thérapies efficaces.

II.5.1. Les cellules « Natural Killer »

Des études passées ont montré l'importance de cibler le VIH-1 le plus tôt possible suite à l'infection¹⁹⁸. En outre, un contrôle précoce de la réplication du VIH-1 par la thérapie

antirétrovirale durant l'infection primaire était associé à des réponses immunitaires spécifiques au VIH¹⁹⁹. En tant que premiers acteurs lors d'une invasion par des pathogènes microbiens, les cellules de l'immunité innée réagissent pour contenir et combattre l'infection. Par ailleurs, les cellules NK sont d'importants composants de la protection immune lors de la phase aiguë de la maladie. Ainsi, une progression rapide du SIDA a été associée avec une fréquence et une fonction réduite des cellules NK. Il a aussi été montré que l'infection par le VIH-1 altère le phénotype cellulaire des cellules NK^{200,201}.

La fonction effectrice des cellules NK est régulée par des récepteurs activateurs et des récepteurs inhibiteurs exprimés à la surface de ces cellules²⁰². Il a été observé que la famille des récepteurs activant les cellules NK, composée de trois membres : NKp30, NKp44 et NKp46, est exprimée à des niveaux plus bas chez les patients infectés par le VIH²⁰³. Des études épidémiologiques ont ensuite mis en évidence l'implication des cellules NK comme médiateurs de la protection durant l'infection par le VIH. Plus de 1500 patients infectés ont été analysés pour comparer les conséquences de l'infection par le VIH, le génotype des molécules HLA et l'expression des récepteurs *killer immunoglobulin-like* (KIR) des cellules NK²⁰⁴. Les KIRs sont composés de récepteurs spécifiques pour les molécules HLA de classe 1. Cette analyse a démontré que la co-expression du récepteur activateur KIR3DS1 et des allèles HLA-B portant le motif Bw4 est associée à une progression retardée du SIDA. Il n'y aurait par ailleurs aucun bénéfice notable si les molécules étaient exprimées individuellement.

Ainsi, l'impact de la fonction effectrice des cellules NK lors de l'infection par le VIH-1 mérite donc des études plus poussées afin de mieux comprendre son rôle dans la prévision de l'évolution de la maladie lors de l'infection primaire par le virus.

II.5.2. Les lymphocytes B

La réponse humorale est une composante importante de l'immunité adaptative. Pendant des années, le développement de vaccin s'est concentré sur l'induction d'anticorps spécifiques à un antigène grâce à leur capacité à induire une immunité suffisante contre un certain nombre de pathogènes (ex : rougeole, hépatite B) en étant produits à des taux faibles²⁰⁵. Ces anticorps durables sont induits par une immunisation en présence de virus tués ou vivants atténués ou des antigènes recombinants. Pour des raisons de sécurité, l'utilisation d'un virus vivant atténué ne

peut se faire dans le cas du VIH-1, nécessitant ainsi le besoin de produire un vaccin alternatif pour induire une réponse humorale spécifique au VIH. Un grand nombre d'anticorps neutralisants (bNAbs) puissants ont été générés par des individus infectés par le VIH-1^{206–208} et plusieurs de ces bNAbs ont été évalués ou sont en cours d'évaluation pour leur utilisation dans des essais cliniques^{209–211}. Un certain nombre d'études animales ont montré que l'administration de bNAbs peut prévenir l'infection et réduire les charges virales lors d'une infection déjà établie^{212–214}. De même, études humaines ont également montré que les bNAbs peuvent réduire les charges virales ou retarder le rebond viral en cas d'interruption du traitement^{211,215,216}. Cependant, le VIH-1 échappe généralement à ces bNAbs lorsqu'ils sont administrés à des animaux ou à des humains infectés^{214,217–219}. En effet, la réponse des anticorps neutralisants est restreinte et cible des épitopes spécifiques de la souche virale, permettant au virus de générer rapidement des mutations afin d'échapper à cette réponse²²⁰. Ces mécanismes d'échappement aux bNAbs n'ont été que peu caractérisés en partie parce qu'aucun anticorps n'a encore été testé dans une cohorte suffisamment importante d'individus séropositifs pour le VIH-1^{221–223}. Néanmoins, pour utiliser les bNAbs chez l'homme pour concevoir des vaccins basés sur leurs épitopes, il est essentiel de comprendre comment les virus peuvent leur échapper. De plus, les anticorps neutralisants spécifiques aux régions conservées des protéines de l'enveloppe du VIH-1, qui seraient donc susceptibles de produire la meilleure des protections, sont extrêmement rares et ne sont souvent pas détectés avant 2 ou 3 ans après l'infection¹⁷⁶.

Chez les macaques rhésus, la présence d'anticorps préexistants circulants semblait affecter les conséquences de la maladie^{224–226}. Dans cette expérience, les animaux ont été immunisés avec des anticorps neutralisants et ensuite infectés par un virus de l'immunodéficience simienne SIV-1²²⁷ chimérique. En comparaison avec les contrôles, les macaques ayant reçu une infusion d'anticorps ont montré une pathogénicité réduite ou un blocage complet de l'infection, et ce quelque soit le site de l'inoculation. Plus récemment encore, dans un essai clinique de phase I chez l'homme, une immunisation passive a permis de réduire près de 250 fois la charge virale dans le sang des patients infectés par le VIH²⁰⁹. Ces données suggèrent donc l'importance des anticorps neutralisants comme médiateurs de la protection contre le VIH-1 lors de l'infection et de son contrôle.

II.5.3. Les lymphocytes CD8⁺

Les lymphocytes T CD8⁺ font partie de la branche adaptative du système immunitaire et ils jouent un rôle clé dans l'immunité contre les pathogènes et les tumeurs. Les cellules T CD8⁺ porteuses du récepteur T approprié peuvent alors reconnaître un peptide présenté par le MHC de classe I^{228,229}. La rencontre initiale entre un lymphocyte T CD8⁺ et un antigène induit une réponse primaire qui consiste en l'activation de la cellule qui initie alors un programme de prolifération et de différenciation en un lymphocyte T CD8⁺ effecteur cytotoxique (LTCs). Après cette réponse primaire, et une fois que l'antigène est éliminé, la plupart des cellules effectrices CD8⁺ meurent, laissant une petite fraction survivante qui persiste pour devenir des cellules mémoires à long terme. Ainsi, s'il y a une rencontre ultérieure avec ce même antigène, les cellules mémoires seront capables de répondre plus fortement et rapidement que la réponse primaire.

L'amorçage des cellules T CD8⁺ nécessite plusieurs stimuli afin de devenir complètement actives pour induire la différenciation et la prolifération (figure 8). Ces stimuli peuvent être divisés en deux grandes catégories : les signaux TCR et les signaux environnementaux, incluant entre autres l'activation et la co-stimulation par les cellules dendritiques (CD80/CD86), les cellules T CD4⁺ et des facteurs inflammatoires ou de croissance solubles (figure 8). Les conditions d'amorçage de la réponse primaire vont donc impacter le développement en aval de la fonction des cellules T CD8⁺ effecteurs. La manière dont ces signaux influencent le devenir et la fonction des cellules T CD8⁺ est aujourd'hui encore peu comprise.

Les paramètres de la fonction effectrice des cellules T CD8⁺ après stimulation par un antigène incluent la prolifération, la production de cytokines (IFN- γ , IL-2, TNF- α) la production de chimiokines (« macrophage inflammatory protein-1 α » (MIP-1 α), perforine, granzymes). La production d'IL-2 et le maintien de la capacité de prolifération des cellules T CD8⁺ ont été associés avec les mécanismes du contrôle du virus^{230,231}. Plus récemment, la production simultanée de ces facteurs solubles par une seule cellule T CD8⁺, appelée réponse polyfonctionnelle, a été associée avec une amélioration de la maladie et de ses conséquences²³².

L'émergence des cellules T CD8⁺ spécifiques au VIH-1 lors de l'infection primaire coïncide avec la réduction initiale de la charge virale par deux à quatre logs par rapport à son pic maximal^{233,234}. Cette association temporelle est l'une des preuves de l'importance de la réponse des cellules T CD8⁺ dans le contrôle de la réplication du VIH-1^{235,236}. Lorsque des macaques infectés par le SIV ont été traités avec un anticorps anti-CD8, le contrôle de la réplication du virus était perdu et la charge virale a augmenté de 20 à 2500 fois durant les 6 jours suivant le traitement aux anticorps^{218,219}. Malgré plusieurs points sujets à discussion dans cette étude, il semble indéniable que l'activité cytotoxique de cellules T CD8⁺ effectrices joue un rôle important en limitant la réplication du VIH.

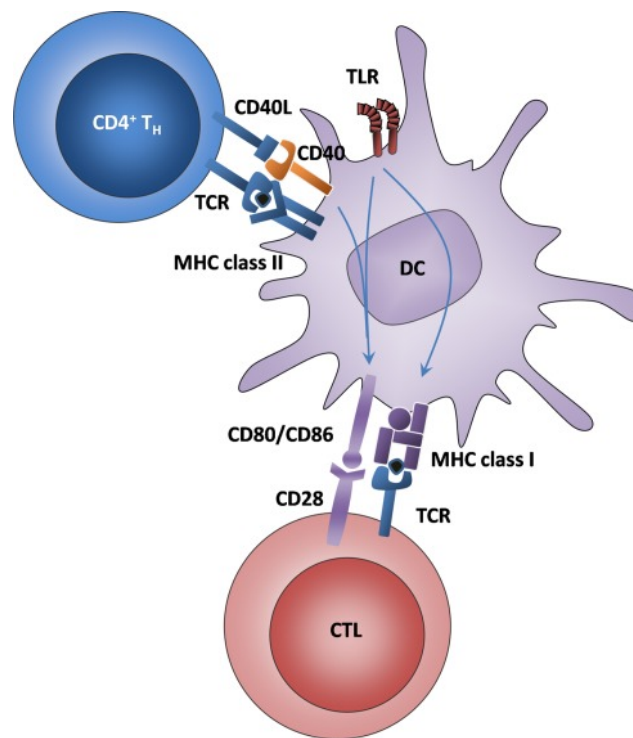


Figure 8. Activation des lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ par interaction avec une cellule présentatrice d'antigène

permission de diffuser par Thaïss, C. A., Semmling, V., Franken, L., Wagner, H. & Kurts, C. Chemokines: a new dendritic cell signal for T cell activation. *Front. Immunol.* 2, 31 (2011). Copyright © 2011.

Il a aussi été montré que les cellules CD8⁺ seraient responsables, au moins en partie, du contrôle de la réplication chez la plupart des patients ECs. En effet, ces patients, en comparaison aux individus ayant une maladie progressive, ont une fraction de cellules T CD8⁺ spécifiques au VIH qui peuvent dégranuler, produire de multiples cytokines et chimiokines fonctionnelles et proliférer plus fortement et plus efficacement lors d'une stimulation par des peptides VIH^{231,232,239-241}. Plus récemment, il a été démontré que ces cellules T CD8⁺ spécifiques au VIH chez les ECs ont une réponse cytotoxique plus forte²⁴²⁻²⁴⁴. Cependant, en raison du manque de compréhension des mécanismes sous-jacents à l'amorçage des cellules T CD8⁺, les moyens d'induire ces cellules pour une éventuelle thérapie contre le VIH sont toujours en cours d'investigation.

La réponse des cellules T CD8⁺ spécifiques au VIH est normalement ciblée sur un petit nombre d'épitopes immunodominants, ce qui facilite la fuite du virus²⁴⁵. Gag et Nef sont fortement immunodominants et commandent une grande partie de la réponse des cellules T CD8⁺ spécifiques au VIH. Cependant, l'immunodominance ne corrèle pas ici avec le contrôle de la réplication. Les réponses spécifiques contre Gag, en contraste avec celle contre Nef, sont associées à un meilleur contrôle de la réplication du virus^{246,247}. Les mutations du virus touchant les épitopes immunodominants ou les motifs d'accompagnement entraînent une altération de la réponse à l'antigène ou une perte de la liaison à la molécule HLA de classe I, permettant ainsi au virus d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte²⁴⁸. Cependant, ces mécanismes échappatoires impliquent évidemment des coûts énergétiques importants pour le virus, mais des études supplémentaires ont démontré la capacité du virus à induire des mutations compensatoires afin de restaurer cette énergie^{249,250}.

Ainsi, comme l'immunodominance établie durant l'infection au VIH, ou reproduite par certains des vaccins développés, ne suffit pas à éliminer ou empêcher l'infection, dépasser cette immunodominance pour induire la présentation d'un panel plus large d'épitopes protecteurs sous-dominants pourrait être une alternative intéressante pour le développement de nouveaux vaccins.

II.5.4. Les lymphocytes CD4⁺

Les lymphocytes T CD4⁺ jouent un rôle clé dans l'orchestration et la médiation des réponses immunitaires contre un pathogène viral. Les cellules T CD4⁺ porteuses du TCR correspondant vont reconnaître les peptides antigènes dans un contexte MHC de classe II présents à la surface des APC. Dépendamment des signaux stimulateurs et des cytokines présents dans le milieu, ces cellules naïves peuvent alors se différencier en cellules T CD4⁺ mémoire ou en un groupe de différentes cellules effectrices CD4⁺. Il y a trois principaux groupes : les cellules T *helper* 1, 2 ou 17 (Th1, Th2, Th17) (figure 9). Une fois différenciées en un phénotype effecteur, ces cellules T migrent aux sites d'infection pour coordonner la réponse immunitaire. Les Th1 secrètent principalement de l'IFN- γ , de l'IL-2 et de la lymphotoxine- α (LTa), tandis que les Th2 secrètent principalement de l'IL-4, 5, 6, 10 et 13²⁵¹. Les cellules Th1 fournissent de l'aide pour la partie cellulaire de la réponse immunitaire. En effet, elles stimulent d'autres types cellulaires, tels que les macrophages. De plus, à chaque fois que l'infection pathogénique ne déclenche pas une réponse inflammatoire assez forte, les Th1 sont alors nécessaires pour la stimulation de la réponse des cellules T CD8⁺ grâce à différents signaux envoyés, tel que la production d'IL-2²⁵². Des études chez la souris ont effectivement montré que le développement des cellules T CD8⁺ mémoires était fortement perturbé lorsqu'il y a déplétion des cellules T CD4⁺^{253,254}. Cependant, les mécanismes exacts sous-jacents à cette induction optimale de la réponse des cellules T CD8⁺ par cellules T CD4⁺ ne sont aujourd'hui toujours pas complètement compris. Les cellules Th2 fournissent quant à eux une aide pour la réponse humorale du système immunitaire²⁵⁵. Elles stimulent les cellules B en sur-régulant la production d'anticorps et en induisant le changement de classe. Les cellules Th17 sont connues pour sécréter de l'IL-17, de l'IL-21 et de l'IL-22. Elles sont importantes pour éliminer les pathogènes et pour induire l'inflammation dans les tissus²⁵⁶. Un autre groupe important des cellules T CD4⁺ est celui des cellules T régulatrices (Tregs). Ces cellules agissent pour supprimer la réponse du système immunitaire et sont importantes pour établir la tolérance périphérique des antigènes du soi.

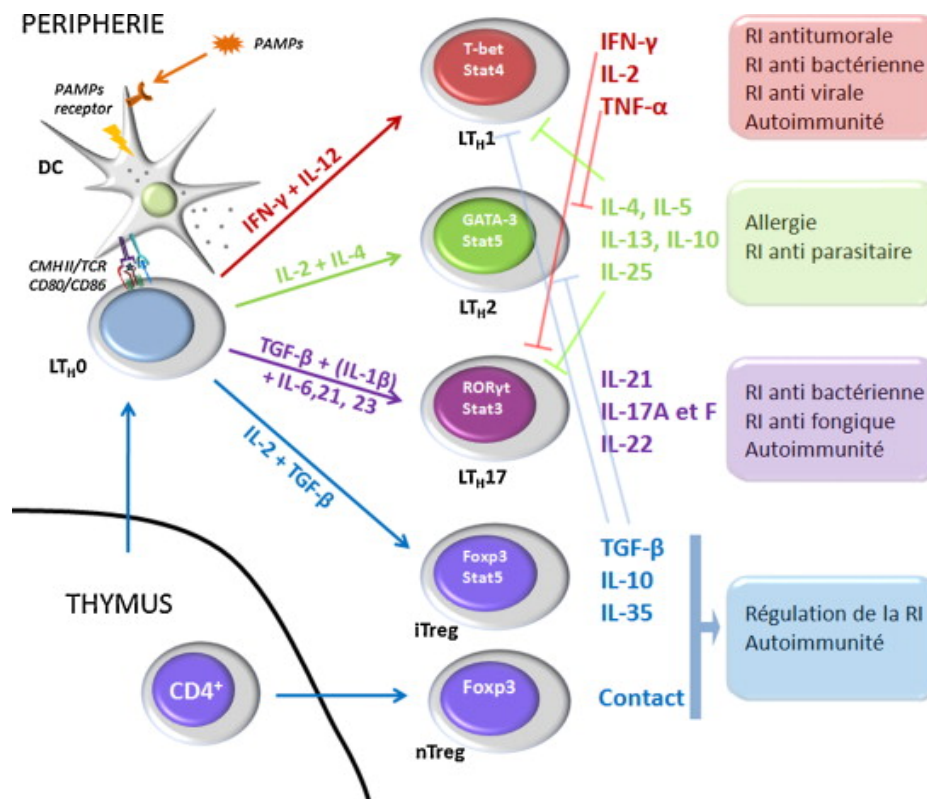


Figure 9. Les différents phénotypes d'activation des lymphocytes CD4+

extrait de Samson, M., Lakomy, D., Audia, S. & Bonnotte, B. Les lymphocytes TH17 : différenciation, phénotype, fonctions, et implications en pathologie et thérapeutique humaine. *Rev. Médecine Interne* 32, 292–301 (2011).

Copyright © 2011 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés

Lors de l'infection, le VIH-1 attaque et détruit en premier les cellules T CD4⁺. Grâce à un fort taux de réplication, le virus se dissémine ainsi à travers les cellules T CD4⁺ dans les premières semaines suivant l'infection, causant ainsi une réduction assez importante du nombre de cellules T CD4⁺²⁵⁷, principalement des cellules Th17 dans le tractus gastrointestinal²⁵⁸. Les cellules Th17 jouent un rôle bénéfique pendant l'infection par le VIH par leur capacité à maintenir l'intégrité et l'homéostasie à la surface des barrières, principalement au niveau l'intestin²⁵⁹. Cependant, plusieurs études ont démontré que le VIH utilise le métabolisme et les caractéristiques de longue durée de vie des cellules Th17 pour sa dissémination et sa persistance^{260–263}. Le rôle exact et la contribution que ces cellules pourraient avoir dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques restent encore à l'étude aujourd'hui. À long terme, le nombre de cellules T CD4⁺ produites par le thymus devient alors inférieur au nombre de cellules tuées par le virus, impliquant une déplétion progressive de cette

population²⁶⁴. Les réponses contrôlées par ces cellules diminuent fortement, compromettant alors le bon fonctionnement du système immunitaire ainsi que le contrôle de l'infection par le VIH-1, ce qui laisse donc la porte ouverte pour des infections opportunistes. De plus, un sous-groupe de cellules T CD4⁺ mémoires dormantes et porteuses d'ADN VIH latent ne sont donc pas éliminées et ne sont pas affectées par une thérapie antirétrovirale, causant un obstacle majeur dans le développement de thérapie visant l'éradication complète du virus chez les individus infectés²⁶⁵. Chomont et al. ont identifié deux réservoirs viraux dans des sous-ensembles de cellules T CD4 + mémoire de sujets viralement supprimés. Le réservoir T central mémoire est le principal réservoir de longue durée pour les patients répondant à la thérapie antirétrovirale. Le deuxième réservoir est hébergé par les cellules T transitionnel mémoire et est le principal réservoir chez les individus avec un faible taux de CD4 +, dont la majorité se caractérise par une activation immunitaire persistante²⁶⁶.

Un autre aspect de la fonction des cellules T CD4⁺ a plus récemment été mis en évidence dans la littérature²⁶⁷⁻²⁶⁹. En plus des APC, il a été démontré que d'autres types cellulaires sont capables de sur-réguler l'expression des molécules MHC de classe II sous certaines conditions, comme dans le cas d'infections virales²⁷⁰. L'expression de molécules MHCII à la surface des cellules infectées par un virus suggère donc un rôle direct des cellules T CD4⁺ dans l'immunité antivirale. En effet, il a déjà été démontré que les cellules T CD4⁺ jouent un rôle dans le contrôle de l'infection par différents virus tels que le virus de l'herpès, de l'influenza murine et de la fièvre du Nil occidental²⁷¹⁻²⁷³. Plusieurs études ont d'ailleurs menées à l'isolation de cellules T CD4⁺ spécifiques à un virus, incluant des cellules cytotoxiques spécifiques à des antigènes viraux du virus d'Epstein-Barr (EBV) ou du VIH^{267,268,274,275}. De plus, une expansion précoce des cellules CD4⁺ exprimant la perforine et le Granzyme A est associée à un contrôle spontané de l'infection par le VIH²⁷⁵, suggérant un rôle important de l'activité cytolytique des cellules T CD4⁺, laissant penser que le développement d'une thérapie ciblant l'induction de la réponse des cellules T CD4⁺ pourrait être une piste à exploiter. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires afin de comprendre exactement les mécanismes menant à la génération de ces cellules T CD4⁺ cytotoxiques spécifiques au virus.

II.5.5. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont divisées en deux grands groupes : les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) et les cellules dendritiques conventionnelles (cDCs).

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes sont des cellules présentatrices d'antigènes qui ont la capacité unique de sécréter une forte quantité d'IFNs et d'autres cytokines en réponse à l'infection par le virus. Ces cellules ont une durée de vie courte et nécessitent d'être constamment remplacées grâce à des progéniteurs qui expriment le FLT3 dans la moelle osseuse et qui maintiennent leur homéostasie stable. Ces cellules immunitaires représentent la première ligne de défense contre les infections virales et ainsi servent de lien majeur entre l'immunité innée et adaptative. La détection de l'infection des virus par les pDCs est contrôlée par la reconnaissance d'acides nucléiques viraux via les récepteurs *Toll-like* (TLR) 7 et 9. L'activation de ces senseurs endosomaux induit alors une série de signaux qui aboutissent ultimement à la stimulation des gènes IFN par l'IRF7 et de cytokines pro-inflammatoires via le NF- κ B²⁷⁶. Les mécanismes cellulaires sous-jacents à la détection du VIH par les pDCs sont partiellement connus. Une grande quantité d'IFN-I est produite par les pDCs lors d'une stimulation par le VIH grâce à la reconnaissance de l'ARN génomique viral via le TLR7. Cette reconnaissance nécessite la présence des protéines de l'enveloppe du VIH et est dépendante de l'interaction de ces protéines avec le récepteur CD4. En revanche, la réplication virale n'est pas nécessaire car les pDCs sont hautement résistantes à l'infection par le VIH²⁷⁷⁻²⁷⁹. Les contacts cellule à cellule avec les lymphocytes T CD4⁺ infectés semblent amplifier la réponse pDCs au VIH mais une fois encore, les mécanismes précis expliquant la différence de l'activation des pDCs dans un contexte cellule seule versus cellule à cellule ne sont pas clairement identifiés^{280,281}.

Les pDCs joueraient donc un rôle important dans la réponse IFN durant l'infection au VIH, arrivant rapidement au site de transmission mucosale²⁸² et migrant ensuite du sang vers les tissus lymphoïdes où elles produisent des IFN pro-inflammatoires et pro-apoptotique²⁸³⁻²⁸⁵. Bien que les pDCs joueraient donc un rôle important dans le contrôle du virus et la régulation de la réponse immunitaire dans la plupart des tissus, il a aussi été reporté qu'elles pouvaient être quantitativement affectées par l'infection par le VIH. Le VIH promeut le déplacement des pDCs vers les ganglions lymphatiques périphériques où une apoptose massive des pDCs²⁸⁶ s'observe, reflétée par une diminution du nombre de pDCs dans le sang des patients infectés²⁸³. De plus, les pDCs sont fonctionnellement affectées par le VIH. En effet, les pDCs stimulées par le virus

expriment des niveaux assez bas des molécules de maturation, induisant d'une part une plus faible réponse de cellules T et d'autre part une sécrétion constante d'IFN-I due à l'accumulation du VIH dans ses endosomes²⁸⁷. L'ensemble de ces résultats montre donc que les pDCs jouent un rôle important et complexe durant l'infection au VIH et cela suggère aussi que l'effet bénéfique ou néfaste des pDCs et de la production d'IFN-I lors de l'infection par le VIH peut dépendre du moment où elles agissent²⁸⁸.

Contrairement aux pDC, qui répondent principalement aux agents pathogènes en sécrétant de grandes quantités d'IFN- α , les cDCs sont des cellules présentatrices d'antigènes qui servent de lien important entre le système immunitaire inné et la réponse immunitaire adaptative. Les CDC sont rarement infectés par le VIH-1, mais ils capturent et intériorisent le virus. D'un côté, les cDCs peuvent activer une réponse immunitaire contre le VIH-1 aux premiers stades de l'infection, en présentant des peptides du VIH-1 aux lymphocytes et en favorisant ainsi la différenciation, l'activation et la prolifération des cellules T et B reconnaissant le VIH-1. Cependant, le VIH-1 utilise également les cDCs pour se déplacer vers les cellules T et stimuler l'infection des cellules T, par le biais d'un processus connu sous le nom de trans-infection, décrit pour la première fois en 1992²⁸⁹. À l'instar des pDC, les cDC jouent donc un double rôle qui peut être à la fois limitant et bénéfique pour l'infection par le VIH-1²⁹⁰.

La modification des DCs et leur utilisation comme outil d'immunothérapie se sont multipliées ces dernières années, notamment dans le domaine des thérapies anticancéreuses²⁹¹. En raison de leurs nombreuses implications et de leur rôle clé dans l'activation du système immunitaire adaptatif et également dans l'infection par le VIH-1, les DCs sont également des candidats prometteurs en immunothérapie dans la recherche d'une cure ou d'un vaccin fonctionnel contre le VIH-1²⁹². Malgré le nombre d'études croissantes sur les DCs et l'infection par le VIH-1, les mécanismes exacts qui déterminent le type de réponse générée sont encore mal compris et des recherches supplémentaires sont nécessaires.

II.6. La thérapie antirétrovirale

Les grandes avancées de la recherche dans la compréhension des mécanismes de la réplication du VIH et de sa pathogénicité ont permis d'identifier plusieurs cibles pharmacologiques. Le premier agent anti-VIH ayant obtenu une licence pour son utilisation en

clinique était le Zidovudine (AZT) en 1987²⁹³. Depuis, plusieurs autres composants anti-VIH ont été approuvés par la FDA (Food and Drug Administration of United States) et la EMEA (European Medicine Agency) pour le traitement du VIH. Ces composants appartiennent à différentes catégories dépendamment de la cible avec laquelle ils interagissent dans le cycle de réplication du VIH.

II.6.1. Les différentes classes de thérapie antirétrovirale

- Les inhibiteurs de la transcriptase inverse:

Les inhibiteurs de la transcriptase inverse interfèrent avec la génération de copies de l'ADN à partir de l'ARN viral. Il y a deux types d'inhibiteurs de la transcriptase inverse que l'on distingue selon leur mode d'action. Le premier type est un groupe d'inhibiteurs de la transcriptase inverse analogue aux nucléosides (NRTIs) qui sont incorporés par la transcriptase inverse virale dans un brin d'ADN nouvellement synthétisé²⁹⁴. Leur forme initiale est inactive et nécessite différentes étapes de phosphorylation successives par les kinases et les phosphotransférases de la cellule hôte pour former des analogues des désoxynucléosides triphosphatés (dNTP) capable d'inhiber la réplication du virus. Les NRTIs ainsi activés vont donc entrer en compétition avec les dNTPs endogènes pour l'incorporation par la transcriptase inverse du VIH. Une fois incorporés, ils agissent comme signal de fin à la chaîne de production du nouveau brin d'ADN proviral par la transcriptase inverse et inhibe donc précocement une étape critique de la réplication du VIH, nécessaire à son intégration dans le génome de l'hôte²⁹⁵. Le second type est constitué d'inhibiteurs de la transcriptase inverse non-nucléosides (NNRTIs)²⁹⁶. Ce sont des petites molécules qui inhibent la transcriptase inverse en se liant à une poche hydrophobique à proximité du site actif de l'enzyme. Une fois l'inhibiteur lié, cela altère la flexibilité de la transcriptase inverse induisant ainsi son inhabilité à synthétiser l'ADN. Cependant, des mutations peuvent causer une résistance au NNRTIs qui diminuent l'affinité de l'inhibiteur pour la protéine. Une seule mutation sélectionnée par un NNRTIs est suffisante pour conférer une résistance complète à l'ensemble des composants de cette classe^{297,298}.

- Les inhibiteurs de la protéase:

Les inhibiteurs de la protéase (PI) interfèrent avec le processus de formation des nouvelles particules virales infectieuses²⁹⁹. La protéase virale est engagée dans la maturation du virion en

découpant une séquence d'acides aminés présents dans les polyprotéines Gag et Gag-Pol. La coupure de la polyprotéine Gag permet ainsi la production de trois protéines larges (p24, p17 et p7) qui contribuent à la structure du virion et à l'empaquetage de l'ARN. Les inhibiteurs de la protéase se fixant sur le site actif de la protéase rentrent donc en compétition avec ses substrats naturels³⁰⁰. Les inhibiteurs de la protéase empêchent donc la coupure des précurseurs des protéines gag et gag-pol dans les cellules infectées chroniquement, stoppant ainsi la maturation et bloquant la capacité d'infection des virions naissants³⁰¹. La résistance du VIH contre les inhibiteurs de la protéase peut se produire grâce à deux mécanismes. Le premier implique des mutations dans le site catalytique de la protéase réduisant ainsi l'affinité de l'inhibiteur mais sans affecter la liaison efficace avec ses substrats naturels. Cependant, ces mutations peuvent parfois affecter son affinité pour ses substrats naturels d'où l'existence du deuxième mécanisme qui permet l'introduction de mutations compensatoires ayant pour but de rétablir une haute affinité de l'enzyme pour ses substrats naturels tout en maintenant une résistance contre l'inhibiteur. Ces mutations compensatoires peuvent arriver aussi bien sur la protéase mais aussi au niveau des sites de coupures de ses substrats naturels^{302,303}.

- Les inhibiteurs de l'intégrase:

Les inhibiteurs de l'intégrase (INSTI) ont été récemment créés pour bloquer l'activité de l'intégrase, une enzyme virale qui insère le génome viral dans l'ADN de la cellule hôte³⁰⁴. Le Raltegravir (RAL) était le premier inhibiteur de l'intégrase approuvé par la FDA en 2007. Les essais cliniques réalisés jusqu'alors indiquent que RAL est sûr et hautement efficace dans le traitement des patients ayant et n'ayant pas encore reçu de thérapie antirétrovirale. Suite à RAL, deux autres inhibiteurs de l'intégrase ont été plus récemment approuvés³⁰⁵⁻³⁰⁸.

- Les inhibiteurs de l'entrée et de la fusion du virus:

Ces inhibiteurs bloquent la fusion virale et son entrée dans la cellule hôte. Ce groupe d'inhibiteurs peut être séparé en différentes classes qui agissent à différents stades de l'entrée du virus : sur la liaison avec le récepteur CD4, sur la liaison avec les co-récepteurs ou sur la fusion^{309,310}. Actuellement, seuls les antagonistes bloquant la liaison CCR5 (Maraviroc) et la fusion (Enfuvirtide) ont été approuvés par la FDA pour le traitement des patients infectés par le VIH, bien que des stratégies pour inhiber d'autres étapes de l'entrée du VIH soient actuellement en développement tels que d'autres inhibiteurs du CCR5 ou encore du CXCR4. Le Maraviroc se lie au récepteur CCR5 et bloque ainsi l'entrée du virus dans la cellule³¹¹. L'Enfuvirtide se lie à

une sous-unité du gp41 et ainsi empêche les changements conformationnels nécessaires à la fusion de la membrane virale avec la membrane de la cellule de l'hôte³¹². La résistance à ce dernier traitement a été observée à la suite de mutations dans le site de liaison de la gp41 à l'Enfuvirtide ou indirectement par des mutations dans d'autres régions de la gp41³¹³.

II.6.2. L'utilisation de la thérapie antivirale

- Les recommandations:

Selon les dernières lignes directives de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en juillet 2019, un patient infecté peut commencer le traitement peu importe le compte de ses cellules CD4⁺, ce qui diffère du rapport de 2013 selon lequel le traitement ne devait être initié que lorsque le compte de CD4⁺ était inférieur à 500 cellules/mm³. Le compte des cellules CD4⁺ est utilisé comme un marqueur de l'habileté du système immunitaire des patients à fonctionner et la charge virale est utilisée comme indication de la progression de la maladie. Quand la thérapie antirétrovirale fonctionne correctement, la charge virale de la personne infectée est en dessous du seuil de détection (50 copies/ml). Si la thérapie ne fonctionne pas, la charge virale augmente et le compte de CD4⁺ diminue. Si une personne atteint un compte de CD4⁺ inférieur à 200 cellules/mm³, elle est diagnostiquée comme ayant le SIDA. Une personne en bonne santé a normalement un compte de CD4⁺ situé entre 500 à 1000 cellules/mm³.

Comme discuté précédemment, le VIH est capable de développer une résistance aux différents inhibiteurs développés comme traitement. Pour contourner ce problème, une approche utilisant une combinaison de différentes thérapies a été développée³¹⁴. Cette approche a été rendue possible grâce au développement des NNRTIs et des PIs. La thérapie combinée peut bloquer la résistance plus efficacement puisque, en plus du fait que l'utilisation de plusieurs agents bloquants est forcément plus efficace que l'utilisation d'un seul, cela requiert la mise en place de plusieurs mécanismes par le virus. C'est ainsi qu'en 1995 a débuté l'ère de la thérapie virale hautement active (*highly active antiretroviral therapy* (HAART)). HAART combine un minimum de 3 agents inhibiteurs qui sont au moins de deux classes différentes. En 2019, l'OMS conseille l'utilisation d'un inhibiteur d'intégrase (dolutegravir - DTG) combiné à 2 NRTIs comme première ligne de traitement préférentielle. Si la première ligne de traitement échoue, par exemple par développement d'une résistance, d'un problème d'absorption d'une mauvaise

adhérence, etc., alors une seconde ligne de traitement est mise en place en combinant un inhibiteur de la protéase en combinaison avec deux NRTIs. Ainsi, la combinaison de différents traitements antirétroviraux avec différentes cibles crée de nombreux obstacles au VIH lors de son cycle de réplication. Cela permet donc de maintenir un nombre de nouveaux virus produits très bas et de réduire ainsi la possibilité d'une mutation créant une résistance.

- Les bénéfices du traitement:

Aujourd'hui, la plupart des patients infectés par le VIH ont la chance d'avoir accès à l'ART et ont ainsi une charge virale plasmatique contrôlée. Le contrôle de la virémie du VIH permet donc d'aboutir à une série de bénéfices immunologiques et cliniques tel que la restauration d'un nombre de cellules CD4⁺ normal qui apparaît dans les premières années après la mise en place de la thérapie. Cependant, la reconstitution des cellules CD4⁺ n'est pas la même pour tous les patients et les raisons à cela ne sont pas encore bien comprises. Dans une étude long terme qui a suivi plusieurs patients ayant reçu l'ART, la majorité a vu leur nombre de CD4⁺ augmenter pendant les deux premières années, suivi ensuite d'augmentations plus petites et ponctuelles³¹⁵. De plus, le traitement ART permet de diminuer l'exposition du système immunitaire aux antigènes viraux, ce qui réduit considérablement l'activation immune et l'inflammation persistantes et permet ainsi une meilleure reconstitution immunitaire³¹⁶⁻³¹⁸. Une charge virale contrôlée et une immunité restaurée sous ART résultent évidemment d'une part d'une différence significative dans l'incidence des maladies liées au SIDA^{319,320} (candidose œsophagienne, sarcome de Kaposi, tuberculose pulmonaire et extra-pulmonaire, lymphome non-Hodgkins, pneumonie bactérienne et de l'herpès), d'autre part d'une diminution drastique du taux de mortalité puis d'une forte augmentation de l'espérance de vie, comparable aux individus non infectés, ont été observés³²¹⁻³²⁴. Par ailleurs, il a été montré qu'une diminution de la virémie (<50 copies/ml) empêche la sélection de mutations permettant la résistance aux traitements^{325,326}. En plus des bénéfices à l'individu, ART a permis de diminuer la transmission du VIH aux patients non infectés grâce au contrôle de la réplication^{327,328}.

L'accès de plus en plus répandu à ART a vraiment fait évoluer positivement le combat contre l'infection au VIH dans le monde. Aujourd'hui, environ 90% des patients sous ART ont un niveau plasmatique d'ARN viral en dessous du seuil de détection, et ce sur de longues

périodes de temps²⁷²⁻²⁷⁷. Malgré ce grand succès, l'échec de l'éradication complète du VIH dû à la présence de réservoir, d'une virémie résiduelle ou d'une activation immunitaire persistante reste un challenge important dans la recherche contre le VIH.

II.7. Un virus spécifique à l'homme : un challenge pour les études *in vivo*

Les récepteurs et les facteurs des cellules hôtes infectées sont critiques pour l'entrée du virus et la mise en place de son cycle de réplication. Pendant plus de trois décennies, des transgènes humains essentiels au cycle de réplication du VIH ont été exprimés chez des rongeurs pour tenter de générer des modèles *in vivo* du VIH, mais les cellules n'étaient toujours pas permissives au virus^{329,330}. Aucune réplication n'a été observée chez des souris et des rats exprimant le CD4 humain, le CD4 et le CCR5 humain. Ces modèles³³¹ ont confirmé la nature spécifique à l'humain du VIH déjà observé *in vitro*.

II.7.1 Les modèles de souris humanisées infectées par le VIH

Le premier modèle de souris humanisée infectée par le VIH fut réalisé en utilisant des souris CB.17 SCID greffées avec un morceau de foie fœtal humain et de thymus fœtal humain sous la capsule rénale⁸. Cependant, ce modèle a restreint l'humanisation de la souris à l'organoïde greffé et il n'y avait donc pas de reconstitution immunitaire et d'infection par le VIH en périphérie. Les souris SCID ayant reçu des PBMC par voie intraveineuse ont été effectivement capables d'être infectées par le VIH¹⁰. Cependant, ce modèle est constitué principalement de cellules T actives et matures éduquées dans un thymus humain (du donneur de PBMC), qui sont rapidement à l'origine d'une GVHD, ce qui réduit considérablement le temps d'étude du VIH *in vivo*⁶⁴. Ces deux modèles ont tout de même permis une meilleure étude de l'infection par le VIH, incluant l'étude des réponses immunitaires (étude de l'effet de la vaccination en utilisant gp160, la réponse CD8⁺ cytotoxiques contre le VIH, tests de différentes molécules pharmaceutiques, l'étude des anticorps neutralisants, etc.). Cependant, ces modèles, de par leurs limites, ne permettent pas de générer une réponse immunitaire complète et efficace pour l'étude du VIH.

Les souris humanisées utilisant les modèles NSG, BRG ou NOG et qui reçoivent une greffe de HSC purifiées de cellules du sang de cordons, de PBMC adultes ou de foie fœtal (humNSG), ainsi que les souris BLT ont démontré de meilleures caractéristiques pour l'infection au VIH³³². En effet, ces souris sont capables de supporter une infection VIH à haut taux. Le nombre de copies d'ARN plasmatique du VIH dans ces souris se chiffre à un niveau similaire à celui observé chez l'homme. Des cellules infectées par le VIH sont détectées dans la rate, les ganglions lymphatiques, le thymus et les poumons, indiquant donc une bonne dissémination du virus. À la différence du modèle SCID injecté avec des PBMC, ces souris sont capables de maintenir un haut taux de réplication du VIH pendant plus d'un an³³³. Enfin, en fonction de la souche du VIH utilisée pour l'infection, les souris peuvent montrer une diminution du nombre de CD4⁺ humain au cours du temps^{334,335}. Ces différents modèles ont ainsi permis d'étudier différents aspects de l'infection par le VIH.

II.7.2. Etude de la transmission du virus et sa prévention

Les principales voies de transmission du VIH sont lors de relations sexuelles vaginales ou anales. Il est donc important pour l'étude de sa transmission que les cellules humaines injectées dans les souris humanisées utilisées soient capables de se greffer au niveau des voies vaginales et/ou dans le tractus gastro-intestinal. Les souris humanisées Rag1^{-/-}γc^{-/-}, Rag2^{-/-}γc^{-/-} et les souris BLT sont les trois modèles dans lesquels les cellules immunitaires peuvent se greffer au niveau du tractus génital ou rectal, rendant ainsi possible l'infection par le VIH au niveau du vagin³³⁶⁻³⁴⁰.

Comme chez l'homme, le petit intestin des souris humanisées contient des patches de Peyer et le gros intestin est peuplé de folliculaires lymphoïdes agrégés avec des lymphocytes T et B, des macrophages et des DCs^{338,339,341-343}. Ainsi, ces souris développent une infection au VIH disséminée après infection par voie rectale ou voie vaginale. Cependant, l'infection et la transmission du VIH pour les souris Rag1^{-/-}γc^{-/-} et Rag2^{-/-}γc^{-/-} étant très faible lorsque greffé avec des HSC issues de sang de cordons³³⁹, cela nécessite une greffe de CD34⁺ issu de foie fœtal et cultivé préalablement avec différents facteurs humains³³⁸. En prenant ainsi avantage de cette remarquable reconstitution mucosale chez les souris BLT, plusieurs études ont permis de tester l'efficacité de nouvelles thérapies antivirales contre le VIH. Ces souris ont aussi permis

l'étude de traitements prophylactiques pour prévenir la transmission par voie vaginale^{337,344,345}. Par exemple, il a été montré qu'une seule injection d'un inhibiteur de l'intégrase, appelé Raltegravir, suffit à protéger les souris BLT d'une infection par le VIH par voie vaginale pendant plus de 4 semaines post administration³⁴⁶.

II.7.3 Etude de la réplication du VIH dans les souris humanisées

L'épuisement du système immunitaire est une des caractéristiques principales des infections chroniques et il a été montré que celui-ci était lié à des conséquences cliniques négatives lors d'une infection au VIH. Ainsi, la mort programmée des cellules via la voie (PD-1)/(PD)L1 joue un rôle majeur dans la dysfonction des cellules T cytotoxiques chez les patients infectés par le VIH. Des BLT infectées avec le virus du VIH ont pu reproduire ce résultat *in vivo* en produisant un fort taux de cellules T PD-1⁺CD8⁺^{347,348}. Dans cette étude, la virémie du VIH a été réduite après un traitement anti-PD1 ou par un blocage de PD-L1³⁴⁷.

L'interféron de type I joue aussi un rôle important dans l'infection par le VIH³⁴⁹. Dans des humNSG, la déplétion des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs), qui sont une source majeure de production d'IFN-I, résulte en une augmentation de la réplication du VIH³⁵⁰. Cependant, la mort des cellules T CD4⁺ infectées par le VIH est freinée malgré une haute charge virale, suggérant ainsi que les pDCs suppriment la réplication virale mais contribuent aussi à l'immunopathogenèse de l'infection par l'induction d'une forte production d'IFN-I^{350,351}. De manière similaire, le blocage du récepteur IFN α/β (IFNAR1) dans ces souris a aussi permis une augmentation significative de la réplication virale, une augmentation du nombre de cellules T CD4⁺ et une meilleure fonctionnalité des cellules T CD8⁺³⁵². Ces résultats indiquent donc la complexité et l'importance du signal des IFN-I durant la réponse immunitaire qui peut ainsi être mieux comprise grâce aux modèles d'infection par le VIH des souris humanisées.

Des cellules HSC modifiées peuvent être aussi utilisées pour tester de nouvelles stratégies afin de limiter ou d'empêcher l'infection par le VIH. Dans la BLT, l'utilisation d'un récepteur à antigène chimérique (CAR) constitué d'un assemblage de deux segments : la partie extracellulaire du récepteur CD4 fusionnée avec le domaine de signalisation de la chaîne ζ du récepteur CD3 CD4 ζ CAR, a permis aux cellules T de se lier à la protéine de l'enveloppe du VIH gp120 et ainsi d'engendrer la destruction des cellules infectées³⁵³. Par ailleurs, la

diminution de l'expression de CCR5 par l'utilisation d'un shRNA inhibant l'expression de ce gène dans les cellules HSC permet de limiter l'infection par le VIH des cellules effectrices^{354,355}. Utilisées ensemble, ces techniques permettent aux cellules T CD4⁺CAR d'être non infectables par le VIH et peuvent empêcher la réplication du VIH *in vivo*³⁵⁶. Cela pourrait être une thérapie bénéfique à long terme, étant donné que les cellules T CD4⁺ exprimant des CAR seront spécifiques à l'antigène du VIH diminuant les chances d'apparition d'effets *off target*.

II.7.4. Etude de la latence du VIH dans les souris humanisées

Des particules de VIH latentes persistent chez les individus infectés, même après une thérapie prolongée par des antirétroviraux qui diminue la charge virale dans le sang à des niveaux inférieurs au seuil de détection³⁵⁷. Ce réservoir stable permet une réapparition rapide du virus consécutivement à une interruption du traitement. La latence du virus a pu être reproduite chez les souris humanisées infectées par le VIH et ayant suivi une thérapie antirétrovirale, permettant ainsi de fournir un outil puissant pour mieux la comprendre et tester de nouvelles thérapies dans le but d'éliminer ce réservoir³⁵⁸⁻³⁶¹.

Par ailleurs, une meilleure compréhension de la mise en place du réservoir peut être alors réalisée à travers l'identification et la localisation des cellules infectées. Les souris humanisées infectées par le VIH et traitées par ART fournissent en effet un modèle important pour mieux caractériser ces cellules. Il a déjà été démontré qu'une sous-population mémoire de cellules T CD4⁺ représente un réservoir de VIH³⁶². Cependant, la possibilité que des monocytes et des cellules myéloïdes soient aussi des réservoirs semble fortement poser question aujourd'hui. En utilisant des souris humanisées qui ne développent pas de T, il a été montré que le VIH a été capable de se répliquer efficacement via les macrophages³⁶³. Dans ce contexte, le VIH s'est largement disséminé (incluant le cerveau), suggérant fortement que les cellules myéloïdes permettent la production du VIH *in vivo*^{363,364}.

La latence du VIH chez les souris humanisées fournit donc un nouvel outil pour l'étude de stratégies thérapeutiques afin d'éliminer définitivement le VIH. Une stratégie appelée « shock and kill » dans laquelle la latence virale est inversée par induction de l'expression de VIH durant un traitement ART a été proposée pour éliminer le réservoir³⁶⁵. En effet, les provirus silencieux peuvent être réactivés par différents types d'agents qui agissent sur la trans-activation

et la régulation de la transcription virale via des séquences LTR^{365,366}. Une étude a donc récemment utilisé un inhibiteur de Tat, connu pour son rôle majeur dans l'inversion de la latence, dans des souris BLT infectées par le VIH et traitées par ART³⁶⁷. Cela a réduit fortement la quantité d'ARNm viral dans les tissus et a significativement retardé et diminué la réapparition du virus après l'arrêt du traitement ART. Il a ainsi été montré que ce traitement a été capable de « bloquer » d'une façon épigénétique les cellules T porteuses de provirus dans une situation de latence profonde, réduisant ainsi leur capacité à produire du virus après cessation de ART.

La technologie CRISPR / Cas9 pourrait constituer un outil potentiel pour l'activation des réservoirs viraux latents du VIH-1³⁶⁸. Le dCas9 catalytiquement inactif, fusionné avec des domaines activateurs de la transcription, peut activer l'expression des gènes viraux dans les réservoirs latents du VIH-1, ce qui peut améliorer la stratégie de *shock and kill*³⁶⁹⁻³⁷¹. Une autre stratégie utilisée a été de cliver le provirus des souris BLT infectées par le VIH en utilisant un multiplex de sgRNA avec l'enzyme Cas9 et cela a permis ainsi démontré dans les 2 à 4 semaines suivant la transduction, des délétions de fragments de l'ADN proviral étaient observables dans différents tissus et organes³⁷².

Une augmentation des niveaux d'expression des gènes stimulés par l'IFN (ISGs) a été décrite dans les souris humanisées infectées par le VIH corrélant avec une diminution de la fonction T CD8⁺³⁷³. Bien que ART inhibe efficacement la réplication du VIH dans les souris BLT, cela ne suffit pas pour complètement réduire l'expression des ISGs ou pour restaurer la fonction T CD8⁺ *in vivo*^{337,346}. D'ailleurs, cette étude a montré que l'expression des ISGs peut être réduite et la fonction T CD8⁺ restaurée en bloquant le signal IFN-I durant l'infection par le VIH, permettant un meilleur contrôle viral ou une réapparition du virus retardée après cessation de ART³⁷³. Cependant, le blocage de IFNAR1 lors du traitement ART a généré une faible réplication du VIH qui redevient indétectable aussitôt que le traitement anti-IFNAR1 est cessé³⁷³. Il est donc possible que le blocage de IFNAR1 puisse à la fois activer le VIH latent et aider à restaurer la fonction CD8⁺³⁷⁴. Ainsi, la combinaison de ces deux effets pourrait peut être aider à éliminer les réservoirs viraux.

II.7.5. Les thérapies contre les VIH par les anticorps monoclonaux

L'utilisation des souris humanisées a été importante pour démontrer le potentiel

prophylactique et thérapeutique des anticorps neutralisants du VIH (anticorps *broadly neutralizing antibodies* (bNAbs)). Les premières études ont montré que l'administration de bNAbs anti-CD4 protégeait les souris humanisées avec des PBMC de l'infection par le VIH³⁷⁵⁻³⁷⁸. Vingt ans plus tard, des modèles de souris humanisées plus sophistiqués et une panoplie de bNAbs du VIH sont maintenant disponibles. L'utilisation de ces bNAbs dans des souris humanisées ont permis notamment de montrer : un contrôle long-terme de la virémie³⁷⁹; une contribution de la fonction effectrice immunologique anticorps-Fc-dépendante dans l'activité des bNAbs³⁸⁰; le potentiel des bNAbs à interférer avec la mise en place et la persistance du réservoir du VIH²¹² et la prévention de la transmission mucosale du virus³⁷⁹. Les souris humanisées ont aussi aidé à clarifier le rôle *in vivo* des anticorps neutralisants et non-neutralisants (nnAbs) communément produits par les individus infectés par le VIH³⁸¹. De manière similaire, certains nnAbs exercent une pression sur le VIH *in vivo* et peuvent tuer des cellules cibles infectées par le virus sensible au nnAbs via des mécanismes effecteurs Fc-dépendant³⁸². Ces observations faites chez les souris humanisées peuvent aider à mieux comprendre la contribution des nnAbs chez les individus infectés.

Au delà de leur utilisation pour mieux comprendre les propriétés antivirales des anticorps du VIH, les souris humanisées fournissent aussi un moyen efficace de développer des nouveaux anticorps dans un but préventif ou thérapeutique. Les souris humanisées ont ainsi permis une évaluation préclinique des bNAbs candidats pour des essais cliniques ainsi que la manière de livrer cette thérapie par les bNAbs³⁸³. Il est surtout important de noter que plusieurs découvertes clés faites chez les souris humanisées ont ensuite été confirmées dans des études faites avec des primates non humains et chez l'homme³⁸⁴⁻³⁸⁶.

Comme avec tous les modèles utilisés en recherche, les données générées avec des souris humanisées doivent être interprétées avec prudence lors de l'analyse des résultats pour les transposer chez l'homme, en prenant pleinement en compte les limites de ce modèle. Un exemple à prendre en considération et qui est encore peu étudié aujourd'hui est l'âge du système immunitaire. En effet, il est connu que chez l'homme le système immunitaire évolue au cours du temps ; un enfant né avec un système immunitaire immature - inné et adaptatif - qui mûrit et acquiert de la mémoire à mesure qu'il grandit. Il entre alors en déclin en vieillissant.³⁸⁷ Cependant cette question a été très peu abordé, il est donc difficile de situer l'âge de reconstitution des souris humanisées puisque la reconstitution change selon la sources de

CD34+ utilisées mais aussi selon l'âge de la souris³⁸⁸. Une étude a montré que chez la souris humanisées avec du sang cordon a un système immunitaire humain qui montre des signes de vieillissement et ne semble donc pas rester néonatal. Le système immunitaire humain présenterait un vieillissement accéléré grâce à des facteurs extrinsèques cellulaires produit par la souris³⁸⁹. Les souris humanisées pourraient d'améliorer notre compréhension du système immunitaire humain vieillissant. Cela pourrait avoir des avantages significatifs en termes de traitement des maladies infectieuses tel que le VIH et d'amélioration des méthodes de vaccination chez les personnes âgées.

Néanmoins, les modèles de souris humanisées pour le VIH sont des outils très efficaces pour étudier un large éventail de domaines de recherche sur le VIH, y compris le test *in vivo* de nouveaux anticorps et de stratégies thérapeutiques et pour approfondir les connaissances concernant le tropisme du VIH, du tropisme tissulaire et cellulaire et de la persistance et de la latence de virus.

III. Projet de recherche

III.1. Problématique et mise en contexte du projet de recherche

Ces dernières années ont donc été marquées par de grands progrès dans le développement de souches de souris immunodéficientes susceptibles d'être greffées avec des cellules et des tissus humains pour créer des modèles souris humanisée^{54,92}. Tandis que la plupart des compartiments immunitaires autres que les lymphocytes T dans ces modèles humanisés sont biologiquement pertinents, l'implantation chirurgicale de tissu de thymus humain est nécessaire à la création de cellules T *de novo* capables de reconnaître un MHC humain présentant des antigènes *in vivo*^{45,57,390}. Des souris humanisées telles que la souris BLT, générés par co-transplantation de cellules souches hématopoïétiques issues de foie fœtal avec du thymus fœtal humain autologue, offrent un puissant système d'étude des réponses immunitaires humaines. Il existe cependant de nombreux obstacles empêchant une utilisation plus généralisée du modèle BLT dans les études réalisées aujourd'hui. Le premier est la taille limitée de l'échantillon fœtal, particulièrement celle du thymus, qui permet rarement de générer plus de 15 à 20 souris humanisées. Le second est la logistique liée à la prise en charge du tissu. Outre le fait que son traitement relève d'un protocole méticuleux, il est évident que c'est un tissu dont la disponibilité et la qualité est difficile à prévoir, compliquant ainsi la programmation d'expériences. Enfin, un des obstacles majeurs est l'enjeu éthique soulevé par l'utilisation d'un tel tissu. En effet, dans certains pays l'accès à ce tissu dans le cadre de la recherche est simplement interdite tandis qu'en Amérique du Nord, de nombreux débats et discussions remettent régulièrement en question son utilisation. Il est intéressant de noter que d'une part le tissu fœtal est à l'origine d'avancées majeures dans le domaine médical, comme le développement du vaccin contre la polio grâce à l'utilisation de lignées cellulaires fœtales dans les années 1960 et que d'autre part, l'utilisation de ce tissu aujourd'hui est à l'origine d'une grande controverse.

Les premières utilisations dans des essais cliniques de tissus fœtaux fut dans les années 1980 sur des patients souffrant de la maladie de Parkinson, une maladie dégénérative progressive dans laquelle les cellules porteuses des neurotransmetteurs de la dopamine commencent à mourir, qui ont été reçu des greffe de cellules fœtale du cerveau^{357,391}.

Les chercheurs utilisent aujourd'hui les tissus fœtaux de plusieurs manières dans les laboratoires. Ils peuvent les utiliser pour effectuer des études sur le tissu en lui-même, en particulier pour comprendre le développement humain, tel que le développement du cerveau, le développement des yeux et des maladies apparaissant tôt dans le développement humain comme le diabète de type 1. Ils peuvent également l'utiliser pour créer des modèles d'étude de maladies humaines. Dans les années 1960, le tissu fœtal a été utilisé pour créer deux lignées cellulaires différentes (WI-38³⁹² et MRC-5³⁹³) qui ont été utilisées pour développer des vaccins, notamment contre l'hépatite A³⁹⁴, la rubéole³⁹⁵ ou encore la varicelle³⁹⁶. Ces lignées cellulaires sont également utilisées comme outils de recherche, notamment dans les études de vieillissement et de toxicité des médicaments. Le tissu fœtal est également utilisé dans les études relatives aux maladies infectieuses et au système immunitaire³⁹⁷, telles que le VIH, le virus de la dengue, le virus de l'hépatite virale, le virus Ebola et la tuberculose. C'est ainsi qu'est apparue l'utilisation de tissus fœtaux pour la création de modèles de souris humanisées. En effet, le foie fœtal est un organe hématopoïétique hautement vascularisé qui permet une expansion importante des cellules souches hématopoïétiques sans perte de leur propriété souche^{398,399}. La purification des HSC à partir de cet organe obtenu entre 16 et 24 semaines de gestation permet d'obtenir jusqu'à plusieurs dizaines de millions de cellules. En comparaison, un sang de cordon ne peut en fournir que quelques millions. Le thymus fœtal, quant à lui, a la capacité, une fois greffé, de croître pour atteindre une taille plus de 10 fois supérieure à sa taille initiale. Ce modèle de souris BLT est ainsi le modèle murin humanisé le plus robuste aujourd'hui disponible⁴⁰⁰.

III.2. Objectif du projet de recherche

Notre laboratoire a l'opportunité d'accéder aux tissus fœtaux grâce à une collaboration avec un centre de planification familiale et ce, par la mise en place d'un consentement éclairé signé par la mère à un moment précis du processus et qui ne peut donc en aucun cas influencer sa décision de mettre un terme à sa grossesse, dans le contexte d'un protocole de recherche approuvé par le comité d'éthique du CHU Sainte-Justine et par le comité d'éthique de ce centre de planification familiale. Ainsi, nous avons pu apprendre à produire des souris humanisées, dont les souris BLT, ainsi qu'à en optimiser la production pour permettre l'utilisation de ce modèle dans un large spectre de domaine grâce à des collaborations. Les deux premières

publications présentées ici sont donc des exemples de projets qui ont impliqués les souris produites par le laboratoire. En parallèle, nous avons donc décidé de remplacer le matériel fœtal par un autre matériel qui permet de remédier à ces trois obstacles importants expliqués précédemment. Pour cela, nous avons développé un modèle appelé *Cord blood and Cardiac Surgery Thymus* (CCST) qui utilise le sang de cordon ombilical comme source de HSC et des thymus excisés lors de chirurgie cardiaque pédiatrique. Ces thymus ont l'avantage d'être non seulement faciles à obtenir puisque considérés comme déchet lors de ces chirurgies mais ils sont aussi de très grande taille, permettant donc une production d'un grand nombre de souris à partir de la même source de matériel.

III.3. Hypothèse

Nous émettons l'hypothèse que la greffe de thymus issu de chirurgie cardiaque pédiatrique peut remplacer le thymus fœtal humain et permettre ainsi l'éducation des cellules T dans un contexte HLA humain lorsque les souris immunodéficientes sont humanisées avec des HSC issues de sang de cordon. Puisque l'on démontre dans les travaux de cette thèse que les souris BLT permettent l'étude des interactions des cellules du système immunitaires humain avec le VIH ou encore l'étude du comportement des cellules souches pluripotentes induites (iPSc) *in vivo*, nous espérons donc pouvoir à terme remplacer les BLT de ces études par ce nouveau modèle CCST.

N.B : Le dernier article est actuellement toujours en cours de préparation pour publication avec un laboratoire collaborateur. Certaines analyses et l'ajout de plusieurs détails dans le matériels et méthodes sont en cours.

CHAPITRE 2 - PREMIER ARTICLE

I. Mise en contexte

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) jouent un rôle crucial dans la réponse immunitaire de l'hôte, en raison de leur capacité à sécréter des taux élevés d'IFN-I et de cytokines proinflammatoires. Dans cette étude, le rôle des pDC a été investigué dans l'infection précoce par le VIH, en regardant si la modulation des niveaux de pDC *in vivo* pouvait modifier l'évolution de l'infection. La tyrosine kinase 3 de type FMS (Flt3) est un récepteur de la tyrosine kinase qui, lors de la liaison à son ligand (Flt3L), induit le développement et la mobilisation de cellules dendritiques dans la moelle osseuse, le sang et d'autres organes. L'effet du Flt3L et de la production d'IFN-I sur l'expansion des cellules dendritiques et par extension sur le développement de l'infection au VIH chez des souris BLT et des souris humNSG a donc été évalué. Enfin, l'effet d'agonistes de TLR7 suite à une stimulation par le Flt3L en l'absence ou en présence du VIH a été étudié. Ce projet de recherche a ainsi pour but d'améliorer les réponses antivirales innées lors des premiers stades d'une infection virale pour envisager éventuellement le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques anti-VIH.

Le détail de tous ces travaux est décrit dans l'article *Flt3L-Mediated Expansion of Plasmacytoid Dendritic Cells Controls HIV Infection in Humanized Mice* par Tram N.Q. Pham, Oussama Meziane, Mohammad Alam Miah, Olga Volodina, Chloé Colas, Kathie Béland, Yuanyi Li, Frédéric Dallaire, Liguozhang, Tibor Keler, Jean V. Guimond, Sylvie Lesage, Cheolho Cheong, Élie Haddad and Éric A. Cohen, publié dans Cell Reports, le 26 novembre (VOLUME 29, ISSUE 9, P2770-2782.E5).

J'ai produit toutes les souris humanisées utilisées dans ces expériences, j'ai vérifié leur bonne reconstitution par cytométrie de flux avant de les donner au laboratoire utilisateur. La production de ces souris en soi est passée par une longue phase de prise en main et d'optimisation de leur protocole de production, qui nous a donc permis d'en fournir en bien plus grande quantité au fur et à mesure du temps.

Flt3L-mediated expansion of plasmacytoid dendritic cells suppresses HIV infection in humanized mice

Tram N.Q. Pham^{1,*,#}, Oussama Meziane^{1,*}, Mohammad Alam Miah^{1,2}, Olga Volodina¹, Chloé Colas³, Kathie Béland³, Yuanyi Li³, Frédéric Dallaire¹, Liguang Zhang⁴, Tibor Keler⁵, Jean V. Guimond⁶, Sylvie Lesage^{7,8}, Cheolho Cheong^{1,8}, Élie Haddad^{3,9} and Éric A. Cohen^{1,8,#}

¹Montréal Clinical Research Institute, Montréal, Canada, ²Department of Physiology, Bangladesh Agricultural University, Mymensingh-2202, Bangladesh, ³Research Center of CHU Sainte-Justine, Montréal, Canada,

⁴Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China, ⁵Celldex Therapeutics, Hampton, NJ, USA, ⁶Centre de Santé et de Services Sociaux Jeanne-Mance, Montreal, Canada,

⁷Department of Immunology-Oncology, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montréal, Canada,

⁸Department of Microbiology, Immunology and Infectiology, Université de Montréal, Montréal, Canada, ⁹Department of Pediatrics, Université de Montréal, Montréal, Canada

* Equal contributions

Address correspondence to:

Éric A. Cohen, PhD or Tram N.Q. Pham, PhD. Laboratory of Human Retrovirology, Montréal Clinical Research Institute. 110 Pine Ave West, Montréal, Canada H2W 1R7. Phone: 514-987-5804; Email: eric.cohen@ircm.qc.ca (ÉAC). Phone: 514-987-5690; Email: tram.pham@ircm.qc.ca (TNQP).

Competing Financial Interests: The authors have declared that no conflict of interest exists.

II. Abstract

Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) are major IFN-I producers and have been shown to be affected by HIV through ill-defined mechanisms. In this study, we directly assess the role of pDCs in early infection, evaluating whether modulating their abundance can alter viral replication. Firstly, HIV infection of humanized mice induces systemic depletion of pDCs, and in the presence of soluble FMS-like tyrosine kinase 3 ligand (Flt3L), pDC levels remain elevated. Flt3L significantly delays the onset of viremia and reduces viral replication via a process that is dependent on pDCs and mediated through an enhanced early IFN-I response. pDCs from Flt3L-treated mice are more prone to express IFN α following TLR7 stimulation but such propensity is gradually decreased during infection. In conclusion, maintaining pDC levels and functions is key to an effective early viral control and in this context, these findings provide a practical insight for anti-HIV strategies and vaccine design.

III. Introduction

Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) are main producers of type I interferon (IFN-I) and play an important role in bridging innate and adaptive immunity. Plasmacytoid DCs express abundantly TLR7 and TLR9 allowing them to recognize respectively, ssRNA as well as unmethylated DNA with CpG motifs, triggering copious release of IFN-I and other pro-inflammatory cytokines (Swiecki and Colonna, 2015). HIV sensing by pDCs occurs predominantly through endosomal recognition of the viral RNA by TLR7 and infected cells were reportedly more efficiently sensed than cell-free virions (Beignon et al., 2005; Lepelley et al., 2011). Sensing in early endosomes leads to IFN-I production, while that in late endosomes/lysosome promotes release of pro-inflammatory cytokines and costimulatory molecules (O'Brien et al., 2011). Human pDCs can secrete all types of IFN-I, with the most commonly known, IFN α and IFN β (Ito et al., 2006). GS-9620, a TLR7 agonist, can inhibit HIV infection in vitro through a mechanism that is dependent on IFN-I produced by pDCs (Bam et al., 2017). However, in vivo, IFN-I responses can be beneficial or deleterious depending on the timing. Indeed, blocking IFN-I signalling in early weeks of simian immunodeficiency virus (SIV) infection resulted in accelerated disease progression and administration of IFN α 2 initially prevents systemic infection in macaques but further treatment promotes an IFN-tolerant state (Sandler et al., 2014). In chronically infected sooty mangabeys, exogenous IFN α 2 brings about a significant but transient decline in viremia (Vanderford et al., 2012). Nevertheless, during chronic infection the presence of pDCs and sustained IFN production could contribute to HIV-induced immunopathogenesis (Li et al., 2014) as persistent IFN-I signaling was associated with aberrant immune activation, heightened inflammation, accelerated cell death and dysregulated immune cell function (Cheng et al., 2017; Herbeuval et al., 2005a; Herbeuval et al., 2005b; Li et al., 2017; O'Brien et al., 2013; Zhang et al., 2015; Zhen et al., 2017). Interestingly, the fact that HIV traffics predominantly to early endosomes favours persistent IFN production (O'Brien et al., 2011), perpetuating a condition that allows for further chronic inflammation and viral persistence. In this regard, IFN-I signaling blockade by an IFN-I receptor antagonist during chronic SIV infection was found recently to lower inflammation, without altering T cell activation/exhaustion or viral replication (Nganou-Makamdop et al., 2018). The effect of HIV/SIV infection on pDC homeostasis had been documented previously although it was not clear whether pDCs were redistributed or

depleted (Barratt- Boyes et al., 2010; Barron et al., 2003; Biancotto et al., 2007; Brown et al., 2009; Donaghy et al., 2001; Kwa et al., 2011; Lehmann et al., 2014; Li et al., 2013; Reeves et al., 2012; Sabado et al., 2010). Indeed, in studies with HIV-infected patients or SIV-infected monkeys, decreased pDC count in the blood was associated with pDCs being accumulated in the colorectum, gut mucosae or associated draining lymph nodes (LNs) (Lehmann et al., 2014; Li et al., 2013; Reeves et al., 2012). In contrast, other investigations in humans and animals documented a loss of pDCs in the blood and LNs (Barratt-Boyes et al., 2010; Barron et al., 2003; Biancotto et al., 2007; Brown et al., 2009; Donaghy et al., 2001; Sabado et al., 2010). It is unlikely that the depletion is a direct effect of the virus since pDCs are largely not susceptible to productive infection because of high levels of endogenous restriction factors such as SAMHD1 (Bloch et al., 2014). As mentioned above, robust IFN-I responses are important in the early control of HIV/SIV infection, suggesting a beneficial role of pDCs. Nevertheless, cellular factors including chemokines produced by SIV-activated pDCs could reportedly recruit target cells to initial sites of viral invasion, thus effectively establishing the infection (Li et al., 2009). This paradox thus implies that spatiotemporal modulation of pDC location and function could conceivably enhance antiviral responses without inciting heightened, detrimental immune activation. In this study, we directly assessed the role of pDCs during early HIV infection in humanized mice, determining whether modulating pDC levels in vivo would shape the course of viral replication. We found that HIV infection induced systemic depletion of pDCs in the periphery and lymphoid tissues. Interestingly, global expansion of DCs by CDX-301, a soluble form of FMS-like tyrosine kinase 3 ligand (Flt3L), led to a significant delay in HIV infection and meaningful reduction of viremia in humanized mice. Importantly, this antiviral effect of Flt3L was dependent on pDCs and mediated through an enhanced IFN-I response as blocking this pathway relieved the viral control by Flt3L. Intriguingly, pDCs mobilized by Flt3L were more responsive to TLR7 stimulation, although their ability to make IFN α was gradually reduced over the course of infection. Overall, our findings clearly demonstrate a protective role of pDCs in early stages of infection, providing a potential rationale towards future development of pDCbased therapeutic approaches to complement conventional anti-HIV strategies.

IV. Results

HIV infection induces depletion of pDCs in humanized mice .We first assessed the impact of HIV infection on pDCs during early infection using humanized mouse models. In this system of humanized NOD-scid IL2R α null (hNSG) mice, viremia levels began to plateau around 21 days post infection (dpi) (Figure 1A). Since the aim was to study the role of pDCs in the early phases, 21 dpi was usually the endpoint in subsequent experiments. Flow cytometry (Figure S1) was used to assess the effect of HIV on pDC homeostasis. At 21 dpi, we observed a significant decrease in pDC frequency, albeit to varying extent between the blood, bone marrow (BM), spleen and gut-associated lymphoid tissues (GALT) (Figure 1B). Indeed, pDCs were decreased by 10- fold in the blood, whereas those in the tissues were reduced by approximately 3 to 5-fold. Notably, there was no concomitant increase in pDC levels in lung and liver (Figure 1B), suggesting that HIV induces primarily a depletion of pDCs in hNSG mice. In sharp contrast, cDCs were largely unaffected by HIV. To ascertain whether the presence of both innate and adaptive immunity would influence the extent of pDC depletion by HIV, we performed similar experiments in humanized BLT mice (Marsden and Zack, 2017) and found comparable viral kinetics as well as similar effect of HIV on pDCs (Figure 1C and D). In both models, pDC level was reduced to a greater extent in the blood than in the BM, spleen or GALT. We speculate that the more profound decrease in pDCs in the blood could have been a combination of cell depletion by HIV and homeostatic mobilization to tissues during infection.

Flt3L treatment reduces HIV infection in humanized mice. Given that pDCs were greatly decreased in early HIV infection, we asked whether expanding this population in vivo could alter the course of HIV replication. As previously documented, we found that a soluble form of Flt3L, CDX-301, induced a marked systemic increase in DC frequencies in the blood and tissues, without having a discernable effect on T cells or monocytes (Anandasabapathy et al., 2015; Masten et al., 2004; Pulendran et al., 2000) (Figure S2). Of note, although cDCs were expanded by about two-fold in blood, spleen, GALT and BM, pDC levels were significantly higher (up to 5-fold) in these compartments. Moreover, pDCs in the non-lymphoid tissues lung and liver were enhanced by at least 10-fold following Flt3L treatment, whereas cDC levels were not significantly affected (Figure S2). Note that similar frequencies of pDCs were obtained

when CD123⁺ cells (Figure S1A) were gated on CD4, BDCA2 or ILT7 (Figure S1B and Figure S2C). In the context of uninterrupted Flt3L treatment, when mice were challenged with the NL4.3-ADA virus (Figure 2A), we observed a nearly complete protection from HIV infection at 7 dpi (Figure 2B). At 14 dpi, viral loads were almost 2-log lower in the Flt3L-treated group and the reduced viremia was maintained throughout the follow-up. Additionally, in tissues of Flt3L-treated mice (BM, spleen, lung and liver), we observed a markedly lowered level of cells carrying the integrated HIV DNA genomes (Figure 2 C-E), or expressing viral proteins (p24⁺). Importantly, this protective effect of Flt3L was sustained over 35 days of infection (Figure 2F), demonstrating a long-lasting effect of Flt3L. The fact that Flt3L treatment enabled a similar control of HIV infection in hBLT mice suggested that the protective role of Flt3L was not altered by the presence of a concomitant adaptive immune response (Figure 2G). Further, we examined the effect of Flt3L on infection with the transmitted-founder virus CHO77 and found a similar control of HIV replication (Figure S3). However, in the context of a potential therapeutic application for Flt3L, when viral propagation had already reached a chronic set-point level, initiating an expansion of pDCs did not lead to a reduction in viremia (Figure S4). We next investigated the effect of uninterrupted Flt3L injections on pDC levels during HIV infection and found that their levels in the blood and tissues remained persistently elevated in infected animals (Figure 3). Flt3L modestly expanded cDCs and in agreement with data shown previously (Figure 1), cDCs were not affected by HIV. As reportedly previously, CD4⁺ T cell level remained constant over the 21-day infection with the NL4.3-ADA virus (Dave et al., 2013), and Flt3L treatment did not alter their frequency except in the BM where CD4⁺ T cells were evidently increased, albeit insignificant statistically. Nevertheless, despite this trend, HIV infection in this organ was still reduced compared to the BM from Flt3L-untreated mice (Figure 2C). Taken together, our findings indicate that Flt3L administration prior to, and during infection, significantly delayed HIV infection and lowered frequencies of infected cells, a phenomenon that was intimately associated with elevated levels of pDCs.

Flt3L treatment reduces HIV replication via a process that is dependent on pDCs. To directly prove that Flt3L-mediated control of HIV replication was a consequence of pDC expansion, we used a pDC-specific mAb to deplete this population from hNSG mice and monitored the effect of such depletion on viral replication (Figure 4A). 15B is an anti- BDCA2 mAb that was shown

to efficiently remove pDCs from the blood and tissues of humanized mice (Li et al., 2014). To this end, we found that while Flt3L led to a pronounced decrease in viremia (median by 1.6 log) (Figure 4B), Ab-mediated depletion of pDCs (Figure 4C) restored viremia to the level of untreated mice, effectively abolishing the Flt3L effect (Figure 4B). Accordingly, frequency of splenocytes carrying HIV genomes (Figure 4D) or CD4⁺ T cells actively expressing viral proteins (p24⁺) (Figure 4E) were comparable between Flt3L-untreated and pDC-depleted, Flt3L-treated groups. These data confirm the involvement of pDCs in Flt3L-mediated control of HIV replication. As expected, cDCs were not affected by 15B (Figure 4C), confirming specificity of the depletion (Li et al., 2014), and likely excluding an essential, direct role of cDCs. Overall, our data clearly demonstrate that Flt3L treatment leads to a control of HIV replication via a process that is entirely dependent on pDCs, thus reaffirming the protective role of pDCs during early infection. Indeed, in the absence of Flt3L, pDC depletion by 15B increased viremia 7.4-fold (median 48,400 vs. 6560 copies/mL) as early as 7 dpi (Figure S5A and B). Interestingly, this viremic difference became less pronounced over time (4.8 fold difference at 14 dpi and 2.6 fold at 21 dpi), most probably because pDCs were being depleted simultaneously by HIV (Figure S4B, right panel). As well, in the context of BLT mice, pDC depletion by 15B abolished viremic suppression induced by Flt3L (Figure S5C). Interestingly, unlike earlier findings in NSG mice (Figure 4B-C), viral loads in the 15B-treated group were higher than that in the Flt3L-untreated group (median 112640 vs. 33760) and correlated with a reduced pDC level (215 vs. 488 cells in 105 hCD45⁺) (Figure S5C and D). Taken together, these findings not only reaffirm the intimate relationship between pDC abundance and viremia but also underline the benefit of expanding pDCs via Flt3L treatment to maintain viral control.

Flt3L-derived pDCs are more prone to express IFN α following TLR7 stimulation. Given that Flt3L-mediated expansion of pDCs reduced HIV infection, we asked if pDCs generated by Flt3L were functionally different from those at steady state. First, we found that pDCs from Flt3L-treated mice were more responsive to ex vivo stimulation with TLR7 agonist R848, as shown by a higher frequency of IFN α -expressing cells and perhaps to a lesser extent, of TNF α -expressing pDCs (Figure 5A). When HIV-infected CD4⁺ T cells were used as a stimulus to mimic a more physiological setting, we noted a similar trend for IFN α , thus validating the results with R848 (Figure 5B). In the case of TNF α , we did not observe a difference between Flt3L-treated and untreated groups (Figure 5B), suggesting perhaps that in the context of

sensing of infected T cells, aside from TLR7 signalling, there may be additional events that regulate TNF α expression in pDCs. Indeed, Webster and colleagues (Webster et al., 2018) previously showed that pDC sensing of arbovirus-infected cells induced an IRF7-restricted response, favouring IFN-I production but not NF- κ B-mediated inflammatory cytokines such as TNF α . At steady state, HLA DR and CD40 were markedly lower on pDCs from Flt3L-treated mice, reflecting perhaps their less mature and/or activated status. Nevertheless, in response to stimulation, pDCs from both groups expressed comparably elevated levels of the markers, indicating that pDCs were indeed activated (Figure 5C).

pDC capacity to sense and make IFN α decreases during HIV infection. Given the results with uninfected mice (Figure 5) and the fact that HIV-1 represses IFN-I responses by exploiting the cross-talk between restriction factor BST2 and pDC-inhibitory receptor ILT7 (Bego et al., 2015), we shifted our focus towards furthering our understanding of how IFN-I response by pDCs might be affected in the context of Flt3L. In HIV-infected mice from both Flt3L-treated and untreated groups, we observed a reduction in the level of pDCs capable of expressing IFN α and this was especially evident at 21 dpi. Nevertheless, at all time points throughout the infection, pDCs from Flt3L-treated mice remained more capable of expressing IFN α than their counterparts from animals not treated with Flt3L (Figure 6 A and B). Interestingly, the decrease in pDC capacity to make IFN α during HIV infection was likely unrelated to activation status since HLA-DR was indiscriminately upregulated on R848-stimulated pDCs from both groups, and at all time points (Figure 6C). Additionally, we did not observe significant proliferation by pDCs in uninfected and infected mice before or after TLR7 stimulation (Figure S6). Importantly, there was no significant difference in the level of Ki67+ pDCs before infection and 21 days post infection (Figure S6). Overall, these findings suggest that Flt3L treatment enhances pDCs quantitatively and qualitatively and that modulating pDC functions may be advantageous for the virus to establish a systemic and chronic infection.

Blocking IFN-I signaling early abrogates Flt3L-mediated control of HIV replication. To gain an insight as to whether the protective effect of Flt3L was specifically mediated through an enhanced IFN-I response, we measured plasma IFN-I over time and assessed if there was a correlation with viral loads. At 7dpi, we found no evidence of detectable IFN-I despite

observing a reduction in viremia in the Flt3L-treated (iso) group compared to the untreated (Flt3L-). However, at 14 and 21 dpi, we observed a positive correlation between IFN-I release and viremia (Figure 7A-B), suggesting that the Flt3L effect could not have been attributed to the increased IFN-I levels sustained throughout the infection. The fact that IFN-I were more readily detectable in the Flt3L-untreated, highly viremic group compared to the Flt3L-treated, virally attenuated group further supports this notion. Unsurprisingly, pDC depletion by 15B suppressed the IFN-I release, reaffirming that pDCs were the primary source of IFN-I in early infection, as was previously shown (Bruehl et al., 2014; Li et al., 2014). As well, consistent with findings shown in Figure 4, Ab-mediated depletion of pDCs restored viremia to the level of Flt3L-untreated group (Figure 7A), reaffirming the importance of pDCs in the viral suppression mediated by Flt3L. Since viral replication can influence the extent of pDC sensing which in turn modulates IFN-I release (Saidi et al., 2016; Wimmers et al., 2018), examining IFN-I response at an earlier time point might allow for a more accurate determination of its involvement in Flt3L-induced control of HIV infection. Additionally, measuring plasma IFNI may not necessarily recapitulate the response in tissues. Thus, we evaluated mRNAs of IFN-stimulated genes in splenocytes at 7, 14 and 21 dpi and observed notably higher levels of OAS1, Mx1 and IRF7 (ISGs) in Flt3L-treated mice at 7dpi (Figure 7C), suggesting an enhanced IFN-I response during the period of viremic control in Flt3L-treated mice. Interestingly, at 14dpi when viremia remained reduced in the Flt3L group, ISG mRNA levels became comparable between the two groups (Figure 7D), implying that as HIV replication was progressing, the enhanced antiviral IFN-I response elicited initially in the Flt3L group might be diminished by the host's reaction to the ongoing viral propagation. Indeed, at 21 dpi, the ISG levels were significantly higher in Flt3L-untreated mice (Figure 7E). In light of these findings, we performed an experiment to determine whether blocking IFN-I signaling early (Zhen et al., 2017) would alter the protective effect of Flt3L. Following confirmation of the neutralizing activity of the anti-IFNAR2 Ab *in vivo* (Figure S7), we treated animals with the Ab prior to HIV challenge and found that blocking IFN-I signaling fully abolished Flt3L-mediated suppression of viremia (Figure 7F). Overall, the findings demonstrate that Flt3L-induced expansion of pDCs provides an early control against HIV by enhancing IFN-I responses.

V. Discussion

Plasmacytoid DCs play a complex role in HIV infection having potentially both beneficial and undesirable effects on the immune system. Here-in, we provide direct evidence demonstrating a protective role of pDCs in early phases of HIV infection. Specifically, *in vivo* treatment with Flt3L, a cytokine that induces expansion and mobilization of DC subsets (Anandasabapathy et al., 2015; Masten et al., 2004; Pulendran et al., 2000) leads to a significant delay in HIV infection and reducing viral replication through a process that is strictly dependent on pDCs. We find that Flt3L-generated pDCs are more responsive to TLR7 stimulation although pDC capacity to make IFN α was decreased during infection. Finally, the protective effect of Flt3L is invariably associated with sustained pDC levels and mediated through enhanced IFN-I responses.

We show that HIV infection induces a widespread depletion of pDCs in the blood and tissues (Figure1). The loss of blood pDCs was previously observed, and in some studies, the decrease was attributed to pDC redistribution to lymphoid tissues (Barratt-Boyes et al., 2010; Barron et al., 2003; Biancotto et al., 2007; Brown et al., 2009; Donaghy et al., 2001; Kwa et al., 2011; Lehmann et al., 2014; Li et al., 2013; Reeves et al., 2012; Sabado et al., 2010). It is currently unclear whether the loss is due to reduced production of pDC progenitors from the BM as was demonstrated in lymphocytic choriomeningitis (LCMV) infection (Macal et al., 2018) or to apoptosis (Brown et al., 2009; O'Brien et al., 2013). In the latter context, the nature of lymphoid tissue architecture in hNSG mice might affect pDC ability to recirculate, thus favouring a microenvironment conducive to apoptosis (Swiecki et al., 2011).

Interestingly, uninterrupted Flt3L treatment was invariably associated with reduced viremia and sustained pDC levels throughout the infection (Figures 2 and 3). Importantly, the effect of Flt3L on viral replication was observed with both laboratory-adapted and transmitted-founder viral strains. The fact that Flt3L-mediated control was completely abrogated when pDCs were depleted unequivocally demonstrates that the protection was mediated by pDCs (Figure 4) although we cannot fully exclude any potential indirect involvement of other cell types. Consistent with findings in rodents (Bjorck, 2001), splenic pDCs from Flt3L-treated mice were more responsive to stimulation with both TLR7 agonist R848 and HIV-infected T cells, as shown by a higher frequency of IFN α -expressing pDCs (Figure 5). Nevertheless, their capacity

to make IFN α was gradually decreased during infection with fewer pDCs expressing IFN α at 21 dpi compared to 7 dpi. We hypothesize that IFN-I response by pDCs is essential to maintain the protective effect of Flt3L and consequently, the reduction might diminish the effectiveness of Flt3L treatment over time. Indeed, viral loads were elevated at 21 dpi compared to 7 dpi despite the fact that pDC levels were similar at both time points. The ability of HIV to modulate pDC function is consistent with previous reports documenting pDC dysfunction in early infection. Indeed, Huang *et al.* (Huang et al., 2011) observed a significant decrease in the frequency of IFN α -expressing pDCs in response to a R848-like TLR7 agonist in patients with acute HIV infection. Along this line, in monkeys with acute SIV infection, activation-induced exhaustion of pDCs and/or expansion of non-functional pDC precursors blunt their responsiveness to viral stimulation (Bruel et al., 2014). Further, the notion of a gradual decrease in pDC function following viral infection is not restricted to HIV or SIV infections. In fact, it was reported in a chronic model of LCMV that the ability of pDCs to produce IFN α progressively decreased as early as 5 dpi and the defect was maintained over the 30-day follow up (Macal et al., 2018). Although plasma IFN α was not detectable in the first 7 days of infection, we show that the protective effect of Flt3L was driven by an early, enhanced IFN-I response since blocking of IFN-I signaling abolished suppression of viremia; we also observed higher ISG levels in tissue at 7 dpi in Flt3L-treated mice. Nevertheless, over the course of infection, it became evident that plasma IFN-I or tissue ISGs could not be predictive/correlated measures of viral control (Figure 7). It is possible that different IFN-I subtypes might have been released unequally and perhaps, those with anti-HIV activity were not as greatly abundant as the others. Indeed, HIV-activated pDCs produce IFN-I subtypes with weaker antiviral properties more plentifully (Harper et al., 2015). As well, IFN-I production is regulated through an autocrine/paracrine loop (Wimmers et al., 2018) and HIV enhances IFN-I release in a concentration-dependent manner (Saidi et al., 2016). In this context, the positive correlation between viremia and IFN-I at 21dpi is analogous to what observed previously within the first 10 days of infection in macaques (Bruel et al., 2014). Consequently, reduced viral replication in the Flt3L-treated animals could conceivably lead to less IFN-I being produced which in turn could impact ISG levels as evident in our study. Taken together, our findings clearly demonstrate the protective role of pDCs during early HIV infection and provide an important insight towards furthering our understanding of critical events that govern viral transmission, systemic viral dissemination and establishment of

persistent long-lived viral reservoirs (Li et al., 2009; Sandler et al., 2014). As shown in this study, the progressive loss of pDC sensing capacity coupled with systemic depletion of pDCs following HIV infection highlights a potential need for development of therapeutic approaches that help maintain pDC functions to ultimately allow for a more robust innate immune response against HIV.

VI. Materials and Methods

Humanized NSG and BLT mice NSG

(NOD-scid IL2R γ manull) mice were acquired from the Jackson Laboratory. Cord blood-derived human CD34⁺ hematopoietic stem cells (HSCs) were isolated by positive selection using human CD34⁺ selection kit (Miltenyi Biotech). 105 of CD34⁺ cells were injected i.v. into sublethally irradiated NSG mice (7 to 11 weeks old). Humanized bone marrow/liver/thymus (hBLT) mice were generated as previously described (Melkus et al., 2006). Briefly, human fetal thymus was implanted under the kidney capsula of 6 to 10-week old NSG mice. In addition to the thymic implant, mice also received (i.v.) autologous fetal liver CD34⁺ HSCs (5x10⁵). Prior to humanization, all mice were preconditioned using gamma radiation with 1 to 2 Gy. Efficiency of humanization was monitored by flow cytometry analysis of human immune cell subsets. Characteristics of humanized mice used in this study can be found in Table S1. The Table also provided information pertinent to the gender of mice used in different experiments. Given the nature of the experimental system used (i.e., humanized mice), mouse gender per se did not have any bearing on the results. Typically, humanized NSG mice were used when they were about 17 to 19 weeks post humanization whereas BLT mice were usually used when they were about 8- 10 weeks post humanization. Human cord blood and autologous fetal thymus and liver were obtained from the Cord Blood Research Bank, Sainte-Justine Hospital following written informed consent from donors and approval of a research protocol by the Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Sainte-Justine institutional review board (CER#2126). Fetal tissues were obtained from a local abortion clinic through our clinical collaborator (J.V.G) and the donors provided written consent prior to acquisition of tissues. As per the Ethic's guidelines, no information regarding the donors were provided to us. Mice were maintained in specific pathogenfree animal facility of CHU Sainte-Justine Research Center or in the animal core facility of the Montreal Clinical Research Institute in accordance with protocols approved by each institution's Institutional Animal Care and Use Committee (IRCM 2015-11 and CIBPAR#582&593). All experiments performed were approved and conformed to the regulatory standards set by the Committees.

Cell lines

HEK 293T cells (ATCC) were generated from epithelial cells that were originally isolated from a female fetal kidney tissue. The Hela TZM-bl cell line (Platt et al., 1998), acquired from the NIH AIDS reagent program, was generated from HeLa cells, a cell line derived from a 30-year-old female patient with papillomavirus-related endocervical adenocarcinoma. HEK-Blue IFN- α/β reporter cells, obtained from InvivoGen, were generated from the parental HEK 293 cell line as aforementioned. HEK 293T, Hela TZMbl and HEK-Blue cells were grown in DMEM media (10% FBS supplemented with Penicillin-streptomycin). The T cell lines CEM.NKR-CCR5 (Howell et al., 1985), MT4 (Harada et al., 1985) and ACH-2 (Folks et al., 1989) were obtained from NIH AIDS reagent program. CEM.NKR-CCR5 cells were derived from the parental CEM T cell line and the latter was isolated originally from a 4-year-old female patient with lymphoblastic leukemia. MT4 cells were obtained by co-culture of leukemic cells from a male patient with male cord blood lymphocytes. ACH-2 cells were generated from a CEM T cell line subclone and contained one integrated proviral copy of latent HIV-1. All three CD4+T cell lines were maintained in RPMI 1640 media supplemented with 10% FBS and Penicillinstreptomycin. All cultured cells were maintained at 37°C and 5% CO₂.

Measurements of bioactive IFN-I using HEK-Blue IFN- α/β reporter cells

Bioactive IFN-I was quantified in plasma using HEK-Blue IFN- α/β reporter cells (InvivoGen) according to manufacturer's instructions. Three-fold serial dilutions of recombinant IFN α (PBL Science) were used as quantitative standards. IFN-I levels were extrapolated from the linear range of the standard curve generated from the quantitative standards mentioned above.

Primary cell cultures: ex vivo stimulation of splenocytes with HIV-infected CD4+ T cells and TLR7/8 agonist Resiquimod R848

MT4 cells were infected with VSV-G pseudotyped, CCR5-tropic NL4.3-ADA-GFP for 48h and at the time of co-culture with splenocytes, approximately 15-30% were GFP+. Splenocytes (106 in 500 μ l), seeded in a 24-well plate were co-cultured with infected MT4 cells (120,000) for 12h. Alternatively, 106 splenocytes (200 μ l in a 96-well U-bottom plate) were treated with R848 (10 μ g/mL; Invivogen) for 3h. Following the stimulation, Brefeldin- A (BioLegend) was added and cells were cultured for another 6h. Splenocytes that did not receive the agonist or those

cultured with mock-infected MT4 cells were used as negative controls. Subsequently, cells were stained for cell surface markers of interest followed by intracellular staining for IFN α and TNF α as described below.

Virus production

5x10⁶ HEK 293T cells (obtained from ATCC) were transfected with 20 μ g of CCR5-tropic pNL4.3-ADA-GFP proviral DNA (Dave et al., 2013), or pCH077.t/2627 (NIH AIDS reagent program) by the calcium phosphate method. To prepare the virus used in co-culture assays, HEK 293T cells were co-transfected with pNL4.3-ADA-GFP and pCMV-VSV-G (Lodge et al., 1997). Culture supernatant was collected at 60 h post-transfection. Virus was concentrated by ultracentrifugation over a 20% sucrose cushion and titered in HeLa TZMbl and CEM.NKR-CCR5 cells (both lines were from the NIH AIDS reagent program). TCID₅₀ was calculated using the Spearman-Kärber method. Flt3L treatment, infection of humanized mice and quantification of viral loads Flt3L (CDX-301) was kindly provided by Celldex Therapeutics (Hampton, NJ). H-NSG and hBLT were treated daily with Flt3L (2 μ g, i.p.) for 11 days before infection and every two days thereafter. This dose was equivalent to 75 μ g/kg, previously found to be nontoxic and well tolerated in human studies (Anandasabapathy et al., 2015). Humanized NSG and hBLT mice were infected (i.p.) with 500,000 and 200,000 TCID₅₀ of virus in 100 μ l of DMEM, respectively. Uninfected mice were injected with 100 μ l of sterile DMEM medium. Plasma HIV-1 viral loads were determined using the quantitative COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 test, version 2.0, Roche (detection limit, <20 copies/ml).

Depletion of human pDCs and blocking of type I IFN (IFN-I) signaling

To deplete pDCs in vivo, 15B, a mAb specific to blood dendritic cell antigen-2 (BDCA-2) was used (Li et al., 2014). In brief, hNSG were treated (i.p) with 15B (100 μ g, equivalent to 4 mg/kg) on alternate day for 5 days before infection and every two days thereafter. Control mice were injected with isotype control IgG2a (Bioxcell). To block IFN-I signaling, mice were injected with anti-IFNAR2 mAb (clone MMHAR2, PBL Science) (i.p., 100 μ g) 24h before infection and every 2 days thereafter (Zhen et al., 2017). Control mice were injected with isotype control IgG2a. To confirm blocking of the pathway, hNSG mice previously treated with

Flt3L for 11 days were injected with 100 µg of the anti-IFNAR2 Ab (or isotype control) for 6 h followed by a 13-hour stimulation with the TLR7/8 agonist Resiquimod R848 (Vaccigrade, InvivoGen) (Cheng et al., 2017). Analysis of IFN-stimulated genes (ISGs) was performed in spleen cells by real-time PCR. In certain cases, efficiency of binding of the anti-IFNAR2 mAb to the receptor in vivo was assessed by flow cytometry using PE-conjugated anti-IFNAR2 mAb (clone MMHAR2, PBL Science).

Cell isolation from peripheral blood and tissues

Mice were bled at different time points before and after infection. Plasma was collected and white blood cells were isolated by treating whole blood with red blood cell lysis buffer (Invitrogen). Infected mice were sacrificed by gas anesthesia overdose and intra-cardiac puncture. Cardiac perfusion was performed before tissues were harvested. Bone marrow cells were isolated from the femur using the needle method. To purify splenocytes, spleens were crushed and passed through a 40-µm cell strainer (BD Biosciences) to yield single-cell suspensions. Lung and liver tissues were digested with a mixture of enzymes (all from Sigma-Aldrich) containing collagenase I (135 U), collagenase XI (27.5 U), hyaluronidase (18 U) and DNase (18 U) in 2 ml of HBSS (Wisent) for 1 h at 37°C. Cell suspensions were filtered through a sterile 70-µm cell strainer and cells purified by centrifugation over 40% and 80% Percoll gradients (Sigma). Cells from gut-associated lymphoid tissues (GALT) were prepared as follows. In brief, intestines were cut into 1-cm pieces and bathed with gentle agitation (450 rpm) in RPMI supplemented with 10% FBS, 5 mM EDTA and 0.145 mg/ml of DTT for 20 min at 37 °C. The tissue was further digested in RPMI containing 750 µg of Liberase, 2 mg of Collagenase V and 173 µg of DNase for 1 h at 37 °C with agitation (500 rpm). Single-cell suspension was obtained by passing the sample through 100-µm and subsequently, 70-µm cell strainers.

Flow cytometry

Blood cells and single-cell suspensions from tissues were stained with fluorescently labeled Abs as desired. Dead cells were excluded using live/dead fixable violet dead cell stain kit (ThermoFisher). Surface-stained cells were fixed and permeabilized using the Cytofix/Cytoperm

kit (BD Biosciences) as per manufacturer's instructions and intracellularly stained for HIV-1 p24 or for IFN α and TNF α . Flow cytometry data were collected on a Fortessa flow cytometer (BD Bioscience) and analyzed by Flowjo software (Versions 9.9.3 and 10.1).

Nucleic acid extraction and quantification of HIV genomes and human genes by real-time PCR

RNA from splenocytes or other tissues were extracted using RNeasy Mini plus kit or QIAzol Lysis Reagent (both were from QIAGEN) according to manufacturer's instructions. cDNA was generated using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) and used as templates for HIV RNA analysis or cellular genes as detailed below. Total DNA from tissue-derived cells were extracted using QIAamp DNA mini kit (QIAGEN) according to manufacturer's instructions. Total and integrated HIV DNA were quantified by modified nested real-time PCR assay using Taq DNA polymerase (BioLabs) in the first PCR and TaqMax Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) in the second PCR (Vandergeeten et al., 2014). DNA from serially diluted ACH-2 cells (NIH AIDS Reagent Program) was extracted and amplified in parallel to generate a standard curve from which unknown samples were enumerated. Human CD3 gene was used as a normalizer. Cellular gene mRNA was quantified using Powerup Sybergreen Mastermix (Applied Biosystems) and primers: GAPDH 5'- GCCATCAATGACCCCTTCATT (forward) 5'- TTGACGGTGCCATGGAATTT (reverse); IFN-A 5'-TCCATGAGVTGATBCAGCAGA (forward) 5'-ATTCTGCTCTGACAACCTCCC (reverse); IRF7 5'- GAGCCCTTACCTCCCCTGTTAT (forward) 5'-CCACTGCAGCCCCTCATAG (reverse); Mx1 5'- CAGCACCTGATGGCCTATCA (forward) 5'- ACGTCTGGAGCATGAAGAACTG (reverse); OAS1 5'- TGTGTGTCCAAGGTGGTAAAG (forward) 5'- TGAGAGGACTGAGGAAGACAA (reverse).

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Data analysis was performed using GraphPad Prism (Version 7). Descriptive measures (mean, median, min/max range and percent) were used to summarize the data. Nonparametric Mann-Whitney's U-tests (two-tailed) were used to compare ranks between two treatment groups. Two-tailed Wilcoxon matched-pairs rank test to compare expression level of HLA DR and CD40

before and after TLR7 stimulation. Pearson correlation analysis was performed to determine if there was an association between plasma IFN-I levels and viral loads. Linear regression was performed prior to Pearson analysis to assess if the relationship between the variables was linear. A P value of less than 0.05 was considered statistically significant. *, **, ***, **** signify <0.05, <0.01, <0.001, <0.0001, respectively; ns, not significant. No statistical methods were used to predetermine population size. Randomization was not used.

DATA AND CODE AVAILABILITY

This study did not generate any unique datasets or code.

VII. Figures

1. Main figures

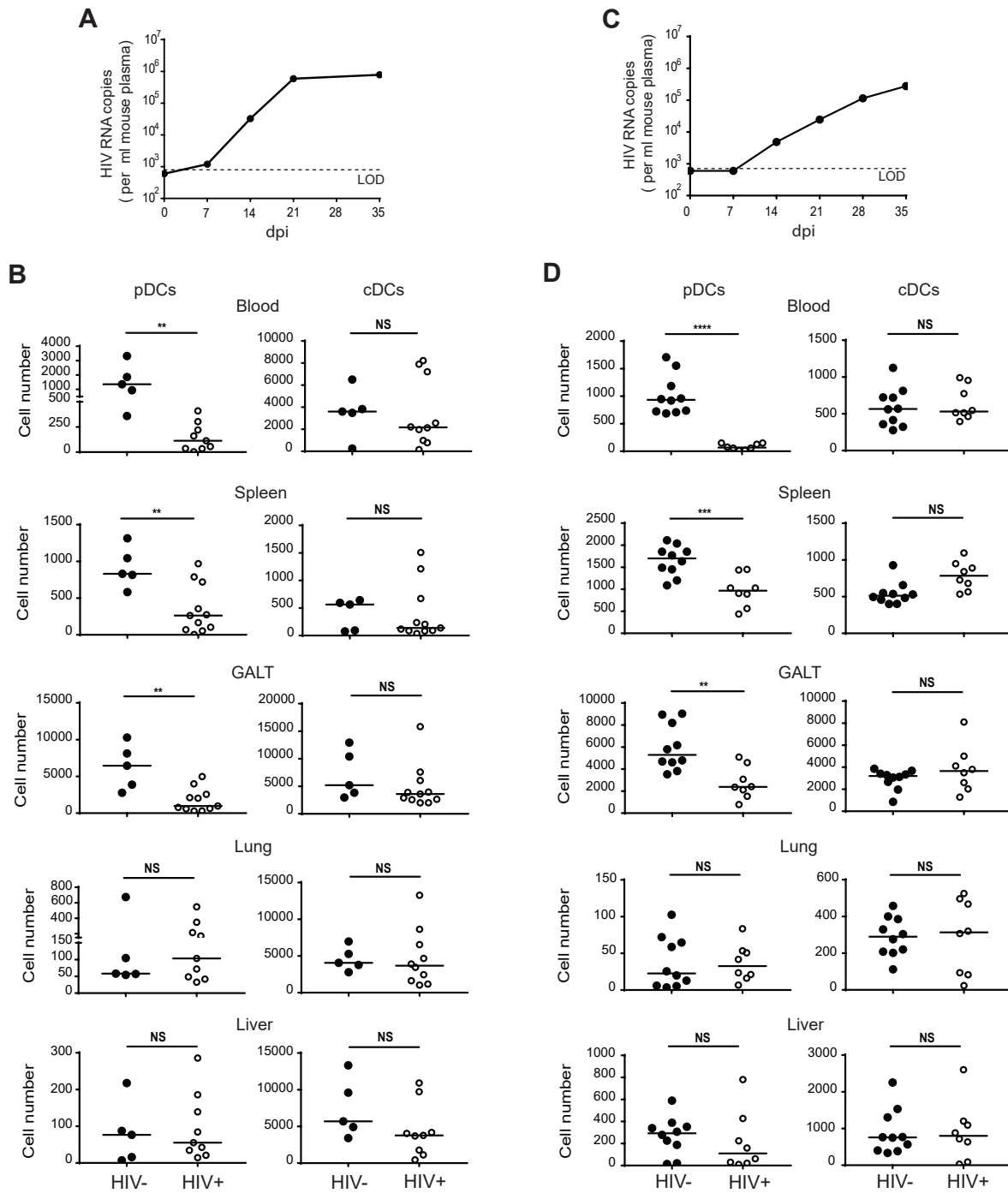


Figure 1. HIV infection induces depletion of pDCs in humanized mice

(A and B) hNSG mice were infected with CCR5-tropic HIV-1 NL4.3-ADA-GFP virus for up to 35 days. Panel A, Plasma viral loads (at least 10 mice per time point) and Panel B, DC frequency (relative to 10⁵ human CD45⁺ cells) from peripheral blood and the indicated tissues at 21 dpi, as determined by flow cytometry. Each dot is one mouse and there are 5 to 10 mice analyzed per group as indicated on graph. (C and D) Same experimental design and analysis as in Panels A and B but for hBLT mice. Panel C has 9 mice per time point. Panel D has 5-10 mice per group as indicated on graph. Each dot is one mouse. Horizontal lines indicate median values. Statistical analysis: two-tailed Mann-Whitney's tests; ns, not significant; * < 0.05; ** < 0.01; ***<0.001; **** <0.0001. LOD, limit of detection. See also Figure S1 and Table S1.

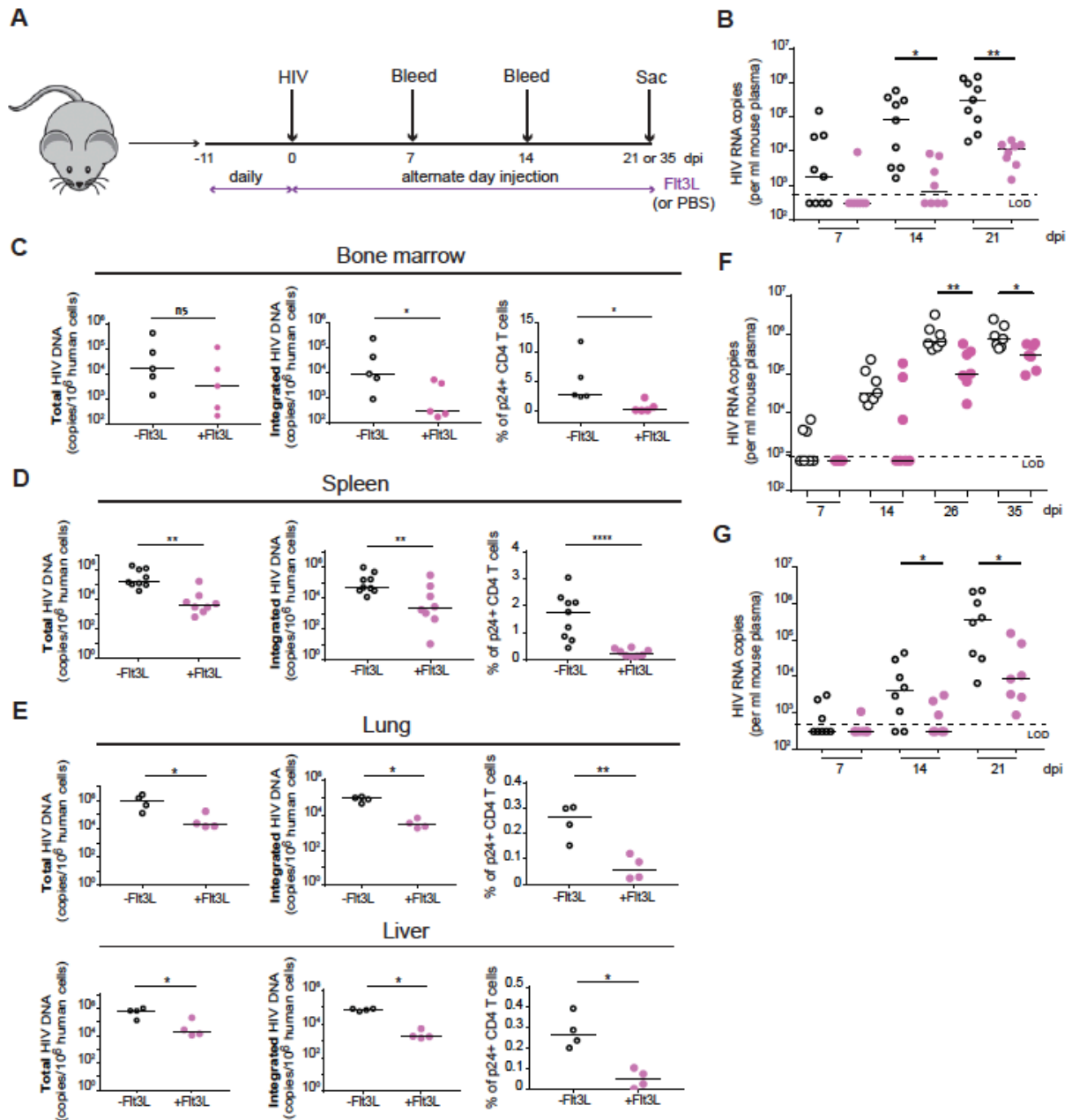


Figure 2. Ftl3L treatment reduces HIV infection in humanized mice

(A) Experimental set-up to evaluate the effect of Ftl3L-treatment on HIV infection in hNSG and hBLT mice. (B) Plasma viral loads over a 21-day infection period in hNSG mice receiving PBS (black circles, 9 mice) or Ftl3L (purple, 8 mice). (C, D and E) Total and integrated HIV DNA were quantified by real-time PCR in bone marrow (5 mice per group), spleen (9 mice in PBS group, 8 mice in Ftl3L group), lung (4 mice per group) and liver (4 mice per group) at 21 dpi.

Frequencies of HIV-infected (p24+) CD4+ T cells were determined by flow cytometry. (F) Plasma viral loads over a 35-day infection period in hNSG mice receiving PBS (black circles, 7 mice) or Flt3L (purple, 7 mice). (G) Plasma viral loads over a 21-day infection period in hBLT mice receiving PBS (black circles, 8 mice) or Flt3L (purple, 7 mice). Each dot represents one mouse. In Panels B through G, horizontal lines indicate median values. Statistical analysis: two-tailed Mann-Whitney's tests; * < 0.05; ** < 0.01; **** < 0.0001. See also Figures S2, S3, S4 and Table S1.

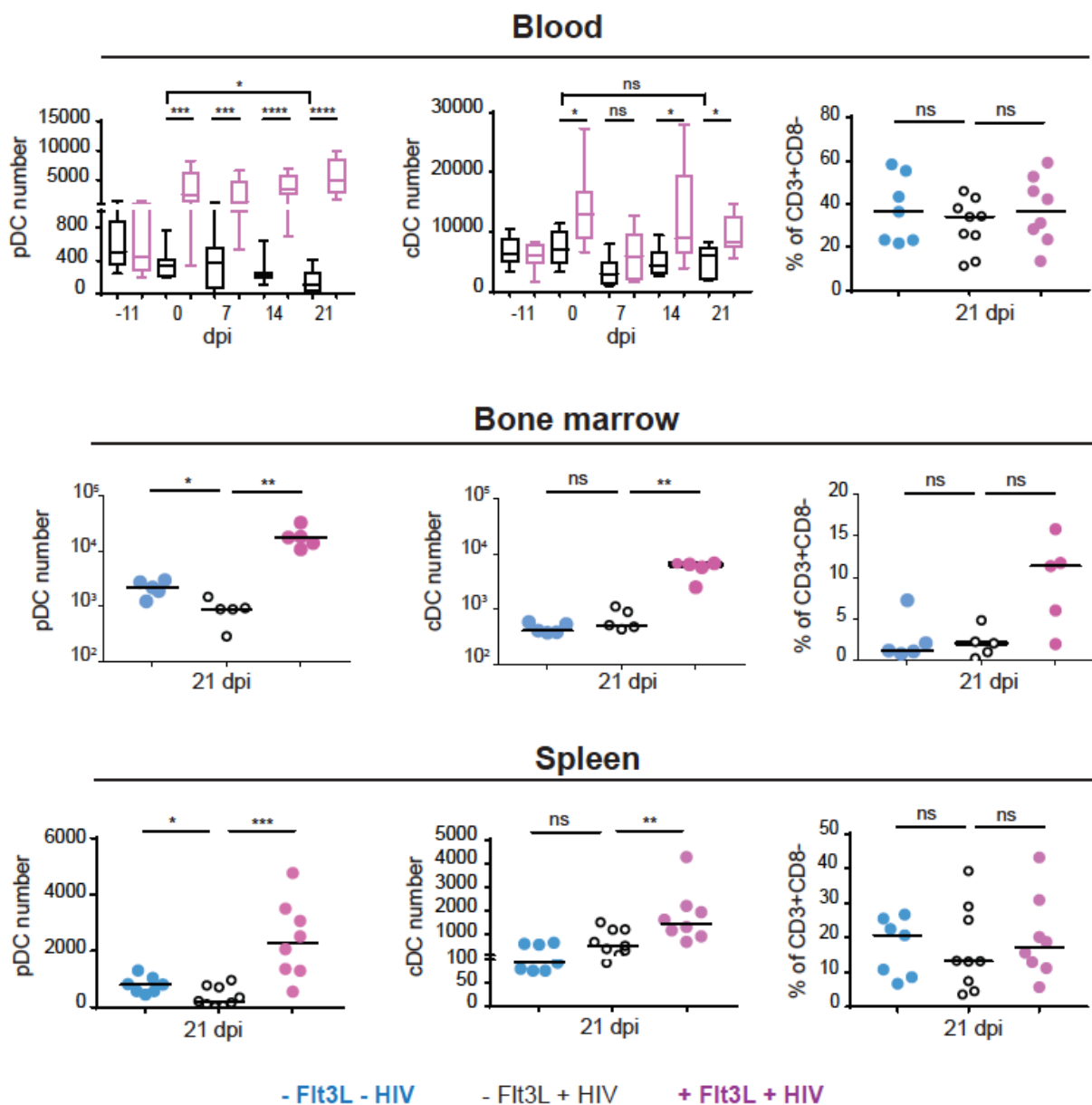


Figure 3. Flt3L treatment helps maintain pDC levels during HIV infection

hNSG mice were administered with PBS or Flt3L and infected with CCR5-tropic HIV-1 NL4-3.ADA-GFP virus as depicted in Figure 2A. Shown are frequencies of DCs and CD4+ T cells in blood (7 mice in uninfected -Flt3L -HIV, 9 mice in -Flt3L +HIV and 8 mice +Flt3L +HIV), bone marrow (5 mice per group) and spleen (7 mice in -Flt3L-HIV, 9 mice in -Flt3L +HIV and 8 mice in +Flt3L +HIV) as determined by flow cytometry. Box and whisker plots highlight min, max and median values. Horizontal lines on scatter dot plots indicate median values. Each dot is

a mouse. Statistical analysis: two-tailed Mann-Whitney's tests; * < 0.05; ** < 0.01; ***<0.001; **** <0.0001. See also Figure S1 and Table S1.

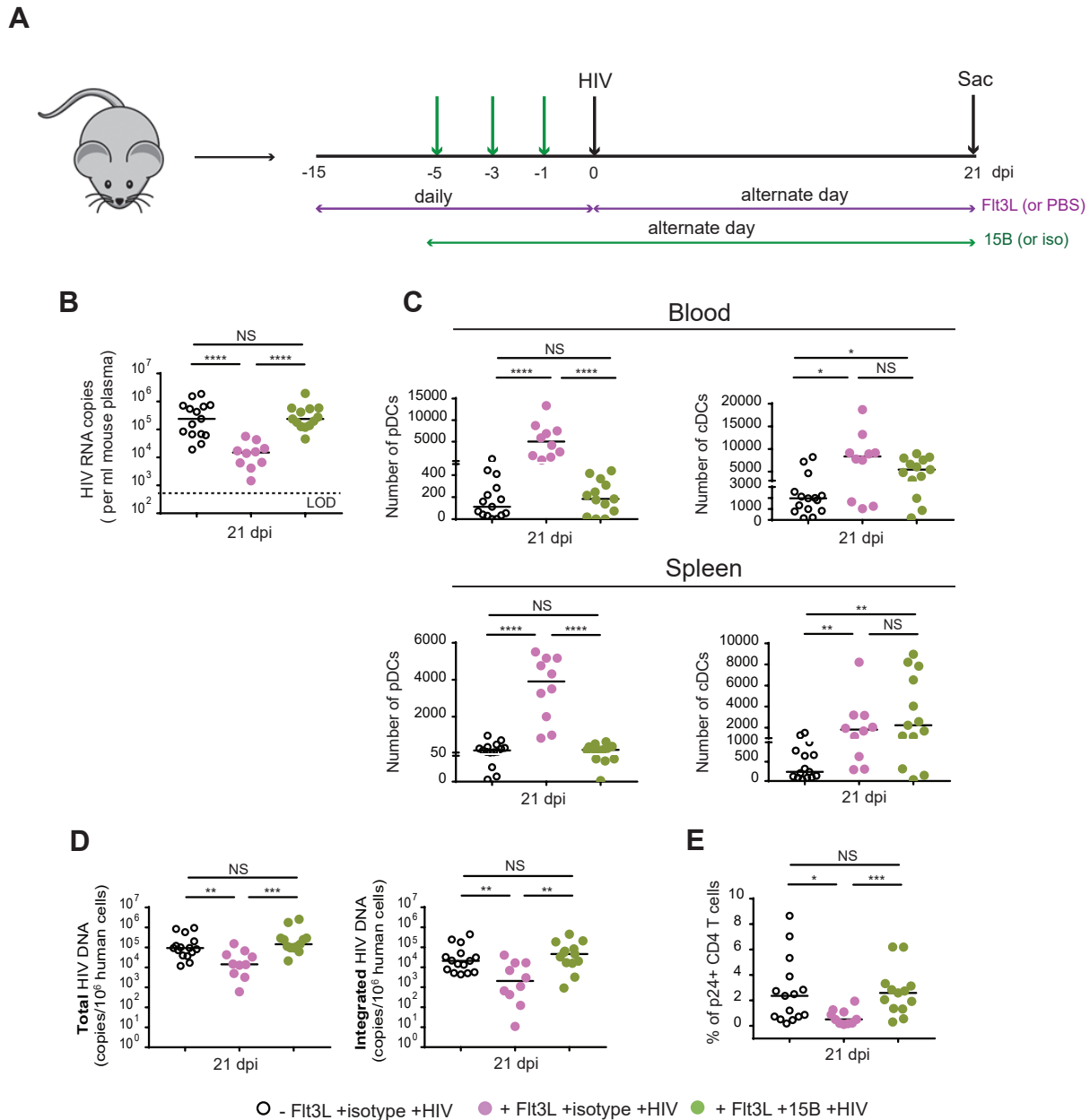


Figure 4. Flt3L treatment reduces HIV replication via a pDC-dependent process

(A) Experimental set-up to determine whether Flt3L-mediated control of HIV infection is driven by pDCs. hNSG mice were administered with PBS or Flt3L as shown and subsequently received three injections of pDC-specific Ab 15B or isotype control. Mice were then infected with

CCR5-tropic HIV-1 NL4-3.ADA.GFP. (B) Plasma viral load at sacrifice. (C) DC levels in blood and spleen. (D) Total and integrated HIV DNA in spleen. (E) Frequency of HIV-infected (p24+) CD4+ T cells in spleen. Each dot represents a mouse. Horizontal lines indicate median values. In Panels B through E, there were 15 mice in -Flt3L+HIV; 10 mice in +Flt3L+iso+HIV and 13 mice in +Flt3L+15B+HIV. Statistical analysis: two-tailed Mann-Whitney's tests; * < 0.05; ** < 0.01; ***<0.001; **** <0.0001. See also Figures S1, S5 and Table S1.

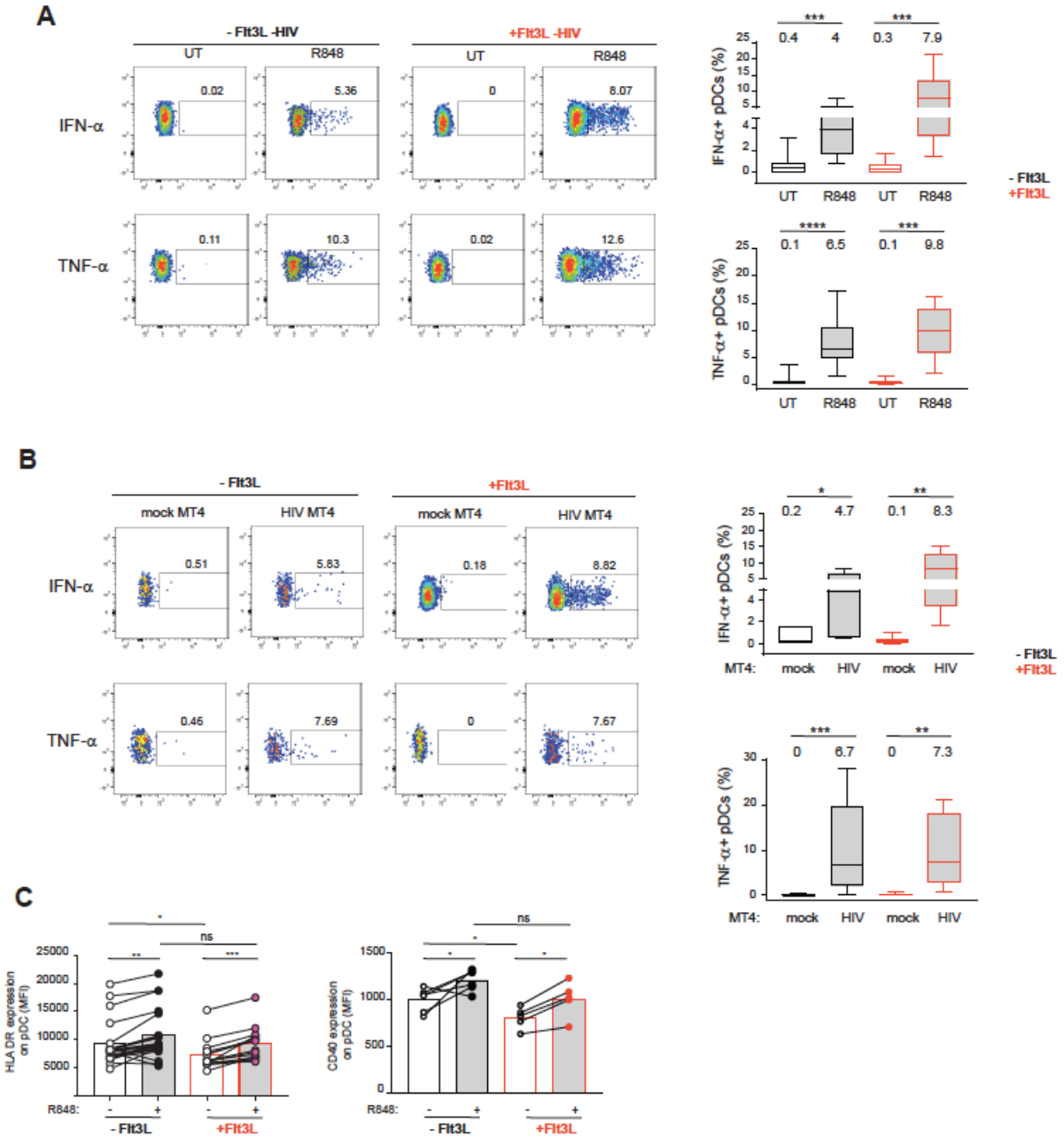


Figure 5. pDCs from Flt3L-treated mice are more prone to express IFN α following TLR7 stimulation *ex vivo*.

Splenocytes from uninfected hNSG mice treated or not with Flt3L were stimulated with R848 agonist or HIV-infected MT4 cells. Unstimulated splenocytes or those cultured with mock-infected MT4 served as controls. (A and B) Left panels, pseudo-color flow graphs of representative mice showing frequencies of pDCs expressing IFN α or TNF α . Right panels, pDC capacity to express IFN α or TNF α following stimulation in different mice. In the analysis with

R848, there were 12 mice per group. In the analysis with HIV-infected MT4 cells, there were 7 mice in the -Flt3L group and 11 mice in the +Flt3L group. pDCs are defined as mCD45-hCD45+CD3- CD14-CD19-HLA-DR+CD123+CD11c-CD4+BDCA2+. Box and whisker plots highlight min, max and median frequencies of cytokine-expressing pDCs. Numbers shown on bar graphs indicate median levels. Statistical analysis: two-tailed Mann-Whitney's tests; * < 0.05; ** < 0.01; ***<0.001; **** <0.0001. (C) HLA-DR and CD40 expression on pDCs before and after stimulation. Expression is depicted in median fluorescence intensities (MFI) from flow graphs. For HLA-DR analysis, there were 18 mice in the -Flt3L group and 14 mice in the +Flt3L group. For CD40 analysis, there were 6 mice in the Flt3L- group and 5 mice in the +Flt3L group. Statistical analysis: Mann-Whitney's test to compare differences among treatment groups (A-C) and two-tailed Wilcoxon matched-pairs rank test to compare differences before and after stimulation within the same mouse (C). See also Figures S1 and Table S1

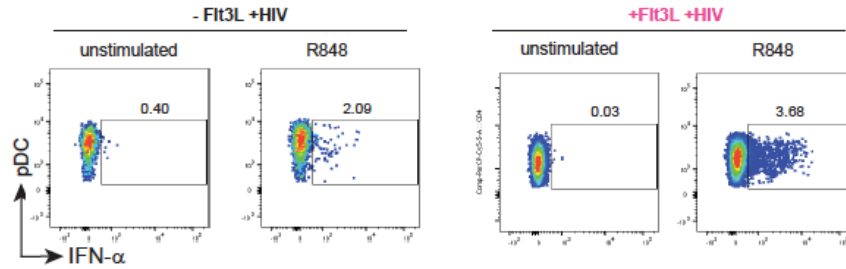
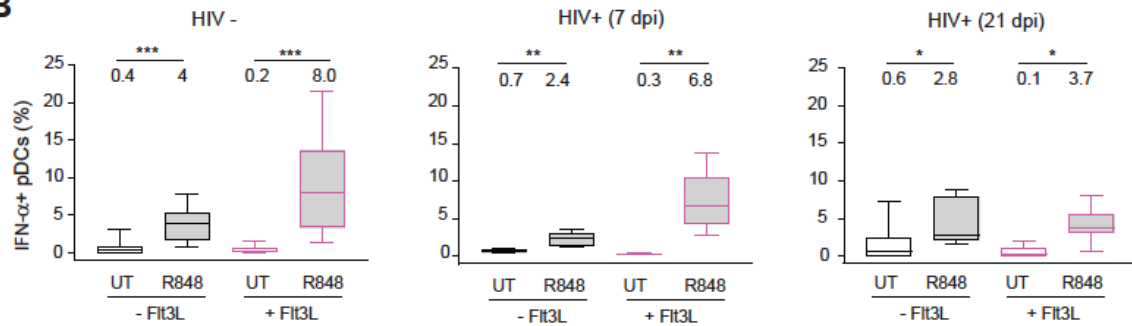
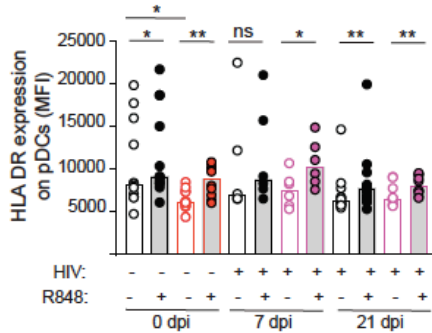
A**B****C**

Figure 6: pDC ability to make IFN α in response to TLR7 stimulation is decreased during HIV infection

Splenic pDCs from HIV-infected mice were analyzed for their ability to make IFN α following R848 stimulation. Infected and uninfected mice received the same number of Flt3L injections at the time of ex vivo analysis. **(A)** Representative flow plots show frequency of IFN α -expressing pDCs at 21 dpi. **(B)** Box and whisker plots of IFN α production by pDCs at different time points during infection. Min, max and median values are as indicated. There were 10 mice per group for uninfected animals; 6 mice per group for the 7dpi and 9 mice per group for the 21 dpi. Numbers shown on top indicate median frequencies of cytokine-expressing pDCs. Statistical

analysis: two-tailed Mann-Whitney's tests; ns, not significant; * < 0.05; ** < 0.01; ***<0.001.

(C) Effect of TLR7 stimulation on HLA-DR expression on pDCs over the course of infection. Shown are median fluorescence intensities (MFI). There were 10 mice per group for uninfected animals; 6 mice per group for the 7dpi and 9 mice per group for the 21 dpi. See also Figures S1, S6 and Table S1. Refer also to Figure 5 legend for the definition of pDCs.

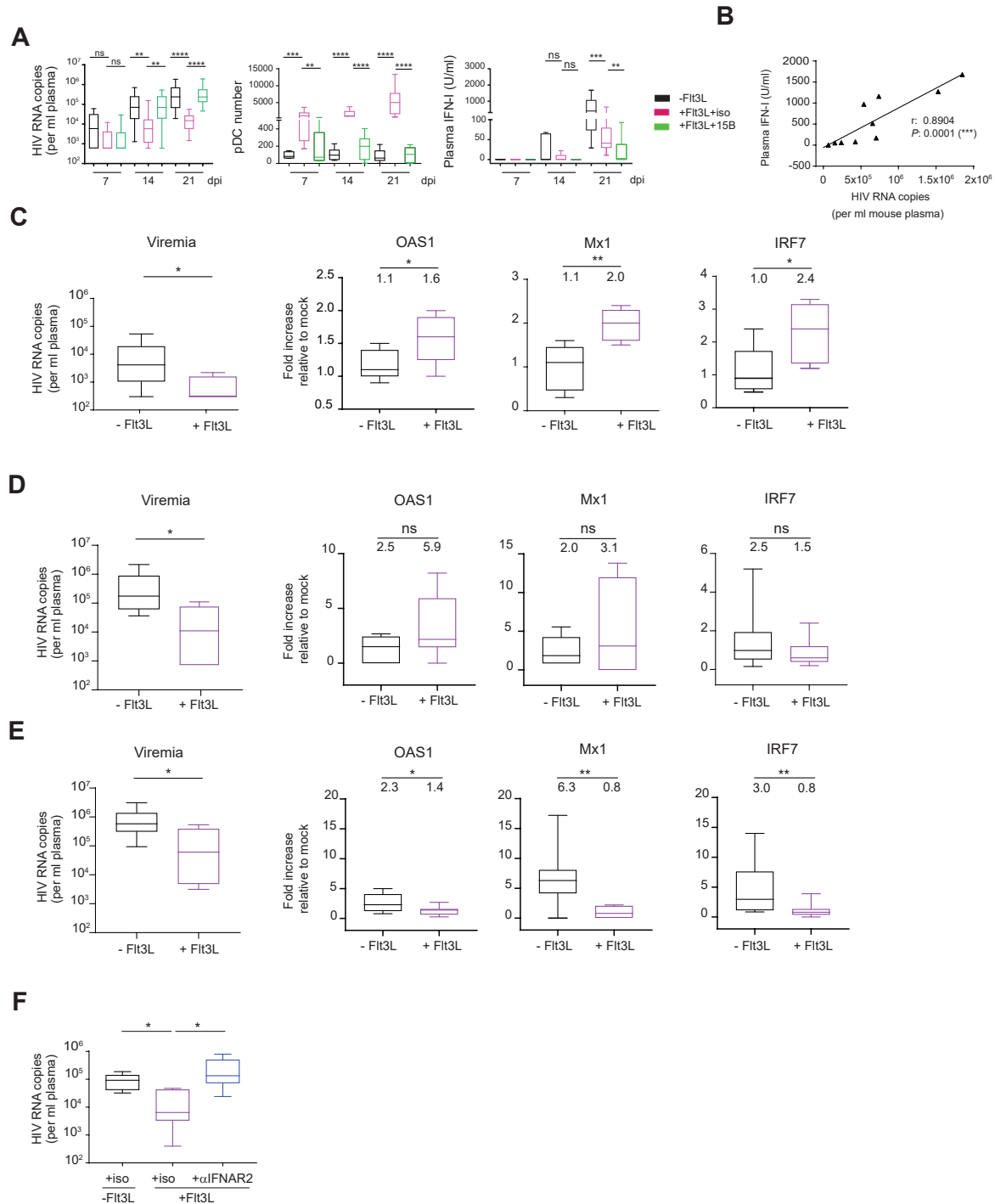


Figure 7: Flt3L-mediated control of HIV replication is driven by early enhancement of IFN-I responses.

(A) Design of the experiment was as described for Figure 4. Plasma viral loads as well as coordinated measurement of pDC frequency and IFN-I were quantified at 7, 14 and 21 dpi. For

the analyses of VLs and pDC frequency at 7dpi, there were 12 mice in the -Flt3L group, 9 mice in +Flt3L+iso and 12 mice in +Flt3L+15B. At 14 dpi, 12 mice in each group were analyzed for VLs and pDC frequency. At 21 dpi, there were 15 mice in the - Flt3L+HIV group; 10 mice in +Flt3L+iso+HIV and 13 mice in the +Flt3L+15B+HIV group. For the analysis of IFN-I, there were 7 mice per group for 7dpi, 6 mice per group for 14 dpi and 18 mice per group for 21 dpi. For each sample, the IFN-I assay was done in biological duplicates. **(B)** Pearson correlation analysis was performed to determine if plasma IFN-I and HIV viremia (21 dpi) were correlated (Pearson r : 0.8904; P : 0.0001). Each point represents a mouse (11 mice analyzed). **(C, D and E)** hNSG were infected with HIV-1 NL4-3.ADA-GFP virus. Plasma viral load and mRNA levels of IFN-stimulated genes (OAS1, Mx1 and IRF7) in splenocytes were evaluated at (C) 7 dpi (6 mice per group), (D) 14 dpi (6 mice per group) and (E) 21 dpi (10 mice for -Flt3L and 8 mice for +Flt3L). **(F)** hNSG mice were injected with Flt3L and at 24h before HIV challenge, treated with α IFNAR2 mAb or isotype control. Flt3L and α IFNAR2 injections were continued for 7 days. Shown are HIV viremia (5 mice per group). For all relevant panels, box and whisker plots highlight min, max and median values. Statistical analysis: two-tailed Mann-Whitney's tests; ns, not significant; * < 0.05; ** < 0.01; ***<0.001; **** <0.0001. See also Figure S7 and Table S1.

2. Supplemental figures and tables

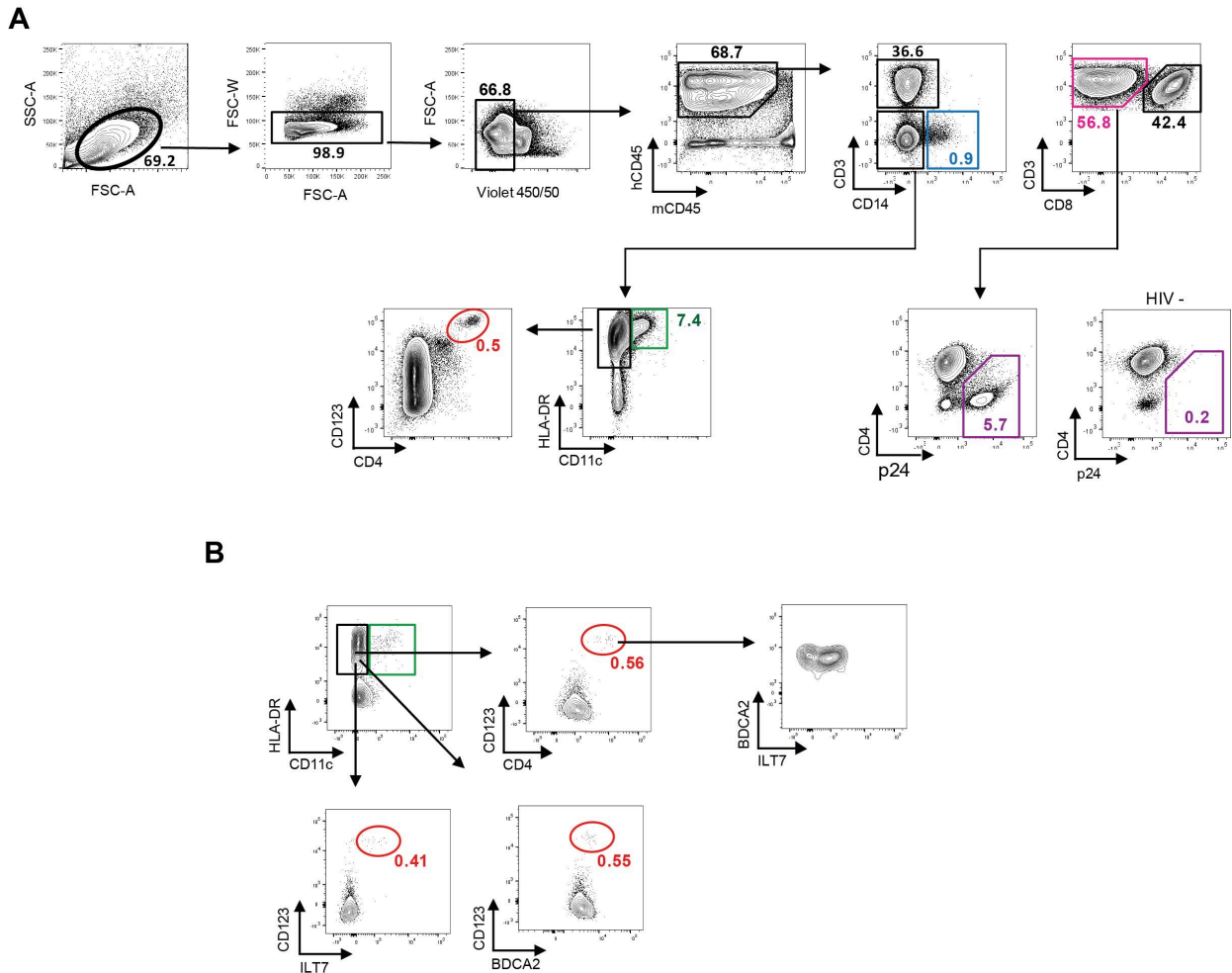


Figure S1. Gating strategy to identify immune cell subsets and HIV-infected T cells using flow cytometry, Related to Figures 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 and Figures S2, S3, S4, S5 and S6

(A) Freshly isolated cells from blood or tissues were stained with a combination of fluorescently labelled Abs to allow for simultaneous gating of different immune cell subsets. Live cells were identified as Violet 450/50dim. Within the gated human cell population (hCD45⁺): monocytes were CD3⁺CD14⁺ (blue; 0.9%); CD4⁺ T cells were CD3⁺CD14⁺CD8⁻ (pink; 56.8%) and CD8⁺ T cells were CD3⁺CD14⁺CD8⁺ (black; 42.4%). Conventional dendritic cells were identified as CD3⁺CD14⁺HLA-DR⁺CD11c⁺ (green; 7.4%) whereas plasmacytoid DCs (pDCs) were CD3⁺CD14⁺HLA-DR⁺CD123⁺CD4⁺ (red; 0.5%). Since 15B, a BDCA2-specific Ab was used to deplete pDCs in vivo in certain experiments, BDCA2 was not routinely used as the marker for pDCs. HIV-infected CD4⁺ T cells were identified as CD3⁺CD8⁺p24⁺ (CD4⁺ or CD4^{dim}) (purple; 5.7%). Shown is an analysis of splenocytes from an HIV-infected mouse. A panel depicting p24 staining of CD4⁺ T cells from an uninfected mouse is shown on the right.

(B) Using the same gating strategy for pDCs as shown in Panel A, Panel B demonstrates that pDC frequency gated on CD123⁺CD4⁺ is highly comparable to that obtained with classical pDC markers BDCA2 and ILT7. Additionally, CD123⁺CD4⁺ pDCs are also positive for BDCA2 and ILT7.

Figure S1. Gating strategy to identify immune cell subsets and HIV-infected T cells

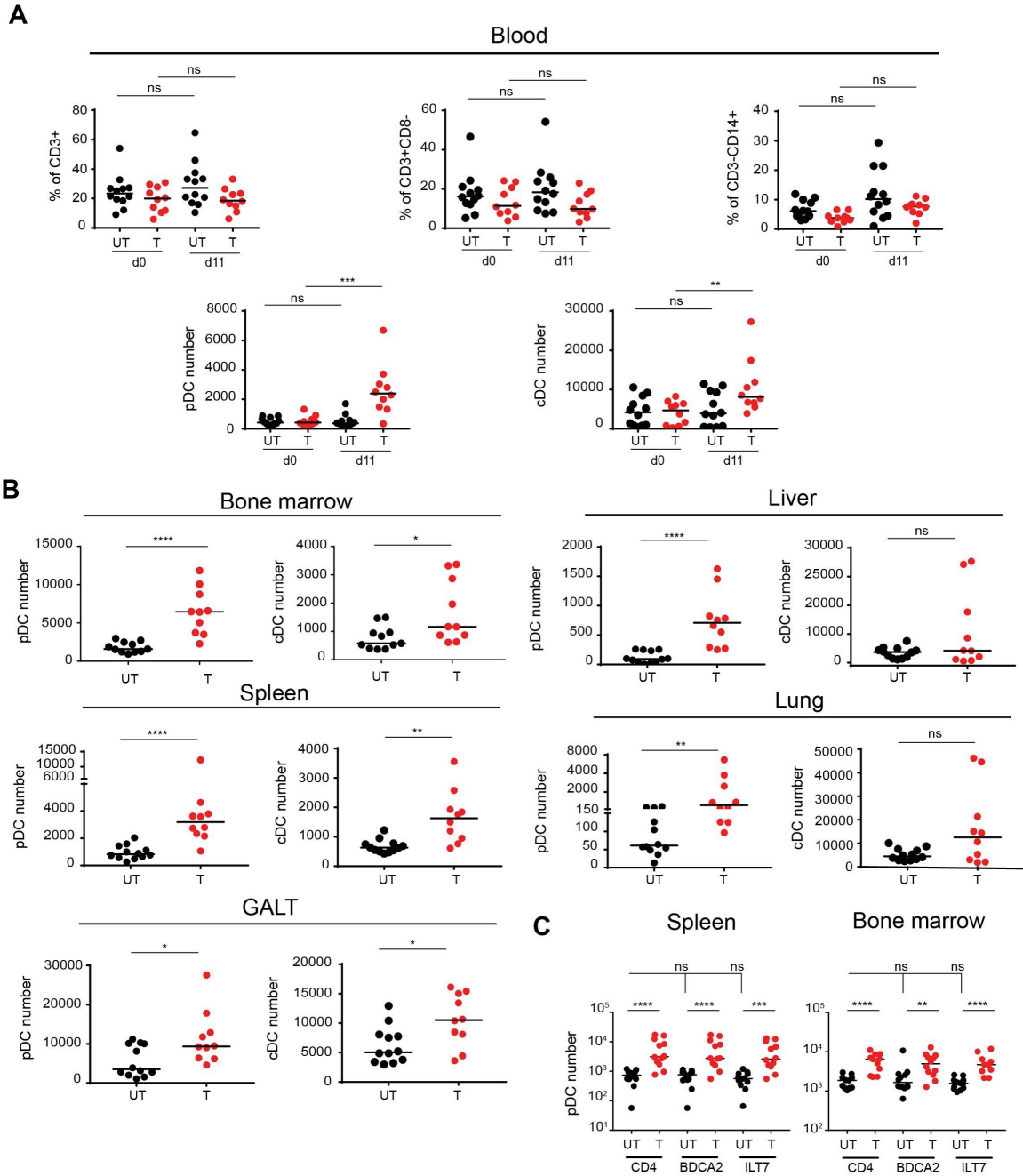


Figure S2. Flt3L treatment expands dendritic cell subsets in hNSG mice, Related to Figure 2.

hNSG mice were injected daily with PBS (UT) or Flt3L (T) for 11 days as described in Method details. Cells from (A) whole blood (B) tissues were analyzed by flow cytometry for changes in different immune cell subsets using gating strategy as described in Figure S1. Within the human cell gate (hCD45⁺), CD4⁺T cells were defined as CD3⁺CD14⁺CD8⁻; monocytes were CD3⁺CD14⁺; plasmacytoid DCs (pDCs) were CD3⁺CD14⁺HLA-DR⁺CD11c⁺CD123⁺CD4⁺ and conventional DCs (cDCs) were identified as CD3⁺CD14⁺HLA-DR⁺CD11c⁺. Shown are percentages of CD3⁺ T cells; CD4⁺ T cells and monocytes. DC levels are reported as number of DCs relative to 10⁵ human CD45⁺ cells. Each graph in Panels A and B had 10-12 mice per group (Flt3L-treated, T or untreated, UT). (C) pDCs from spleen and bone marrow of mice treated or not with Flt3L (n=11 mice per group) were quantified by flow cytometry using the gating strategy shown in Figure S1. For comparison and validation, pDCs were gated on CD4, BDCA2 or ILT7 as depicted in Figure S1B. Each dot represents one mouse. Horizontal lines indicate median values. GALT, gut-associated lymphoid tissues. Statistical analysis: two-tailed Mann-Whitney's tests; ns; not significant; * < 0.05; ** < 0.01; *** < 0.001; **** < 0.0001.

figure S2. Flt3L treatment expands dendritic cells subsets in NSG mice

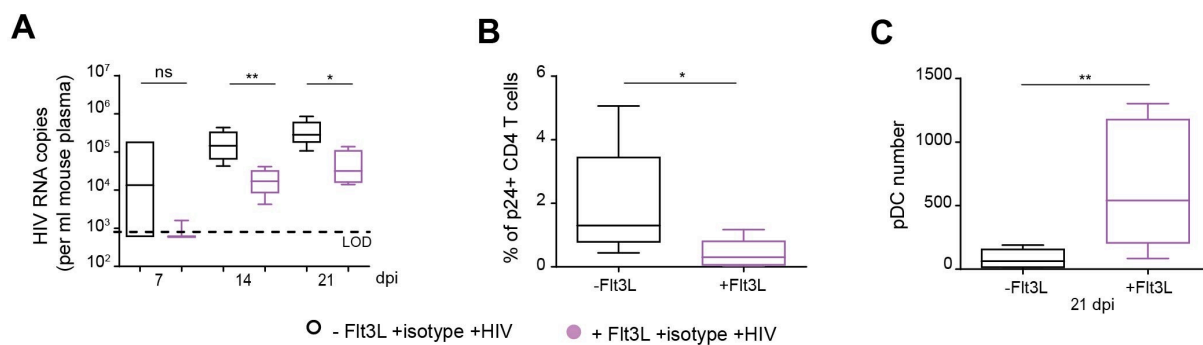


Figure S3. Flt3L treatment reduces HIV replication of HIV T/F in hu-mice, Related to Figure 2.

hNSG mice were injected with PBS or Flt3L and infected with CHO77 for 21 days.

(A) Plasma viral loads over a 21-day infection period in hNSG mice injected with PBS (black) or with Flt3L (purple).

(B) Frequencies of HIV-infected (p24⁺) CD4⁺ T cells in the spleen were determined by flow cytometry.

(C) pDC frequency in spleen was determined by flow cytometry.

Each graph had 5 mice per group. Box and whisker plots highlight min, max and median values. Statistical analysis: two-tailed Mann-Whitney's tests; ns; not significant; * < 0.05; ** < 0.01.

Figure S3. Flt3L treatment reduces HIV replication of HIV T/F in hu-mice

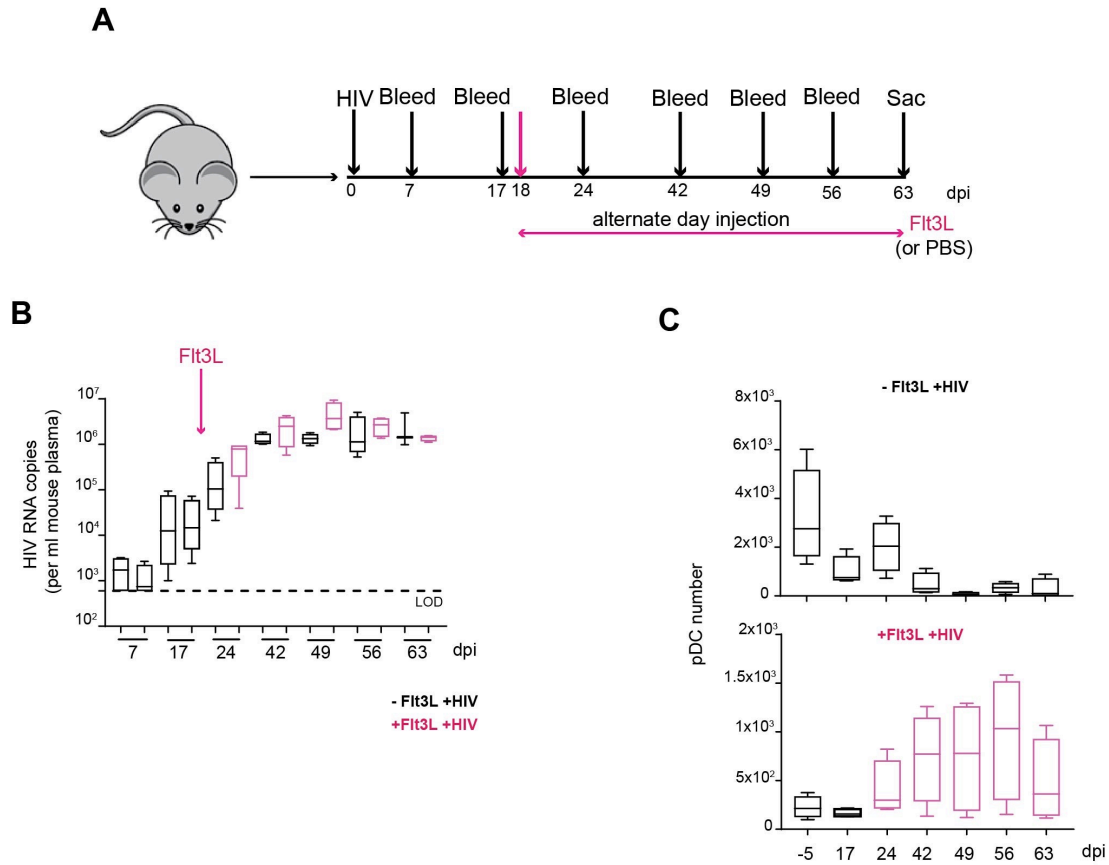


Figure S4. Investigating a potential therapeutic effect of Flt3L treatment in HIV infection of humanized mice, Related to Figure 2.

(A) hNSG mice were infected with CCR5-tropic HIV-1 NL4.3-ADA-GFP virus for 17 days. At 18 dpi, mice were injected with Flt3L (or PBS) on alternate days until the end of experiment.

(B) Median plasma viral loads (4 mice per group).

(C) Levels of pDCs (relative to 10^5 human $CD45^+$ cells) in the blood over the course of study (4 mice per group). Box and whisker plots highlight min, max and median values.

Figure S4. Investigating a potential therapeutic effect of Flt3L in HIV infection of humanized mice

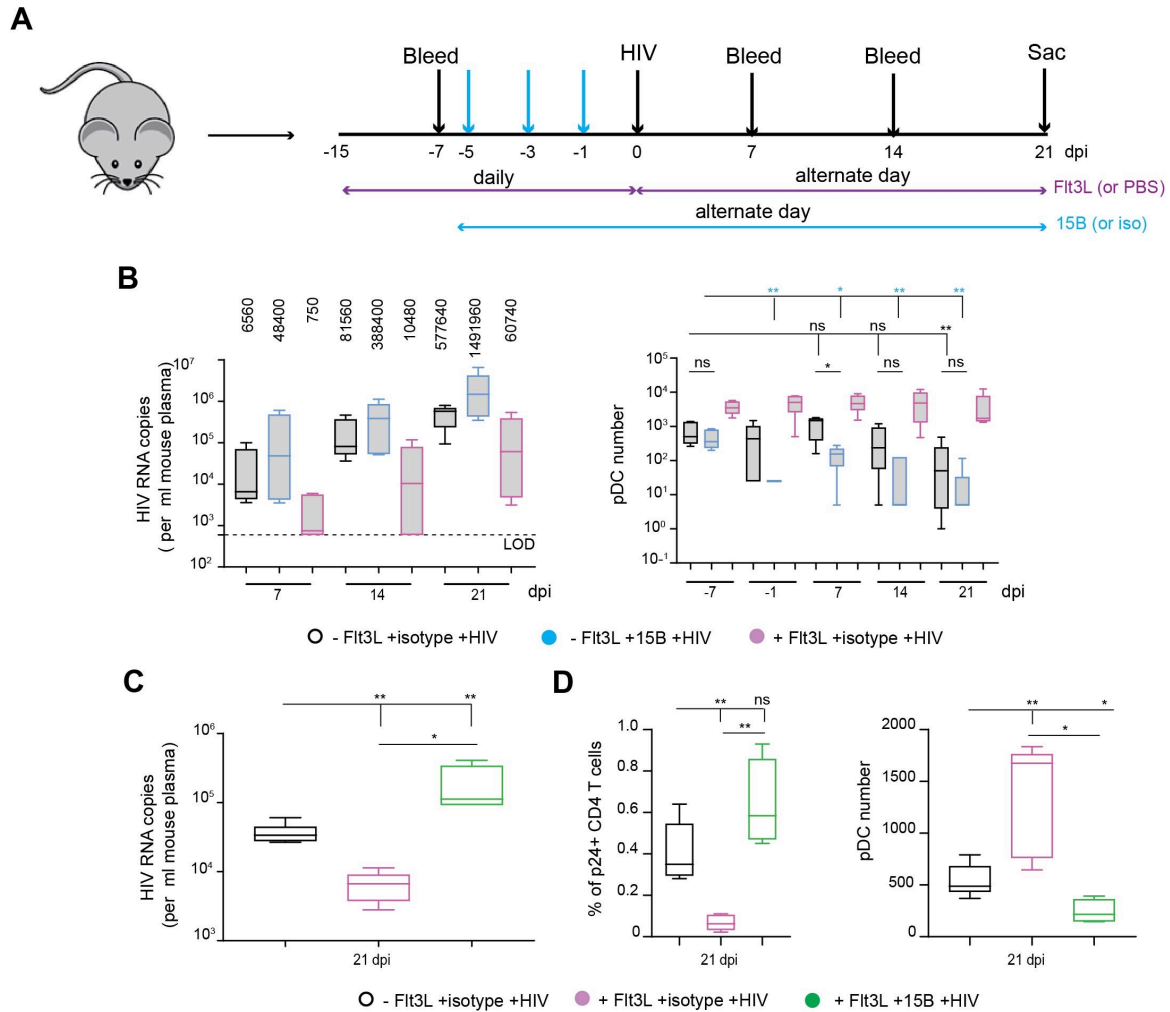


Figure S5. The role of pDCs in HIV infection in the presence or absence of Flt3L treatment, Related to Figure 4.

(A) Experimental set-up to evaluate the role of pDCs during HIV infection of hNSG in the absence of Flt3L treatment.

(B) Plasma viral loads and peripheral pDC levels over a 21-day infection period in hNSG mice that received PBS (black) or pDC-depleting 15B (blue). Infected mice administered with Flt3L (pink) were used as a control. There were 5 mice per group. Median viral loads are indicated on the top of the graph.

(C and D) hBLT mice received PBS (black) or Flt3L (pink) for 11 days and subsequently received three doses, on alternate day, of pDC-specific Ab 15B (green) or isotype control (pink). Mice were then infected with CCR5-tropic HIV-1 NL4-3.ADA.GFP. Shown are (C) plasma viral loads and (D) percentage of infected (p24⁺) CD4 T cells (left) and pDC frequency (right) in the spleen. Each graph had 5 mice per group. Box and whisker plots highlight min, max and median values.

Statistical analysis: two-tailed Mann-Whitney's tests; ns; not significant; * < 0.05; ** < 0.01.

Figure S5. The role of pDCs in HIV infection in the presence or absence of Flt3L treatment

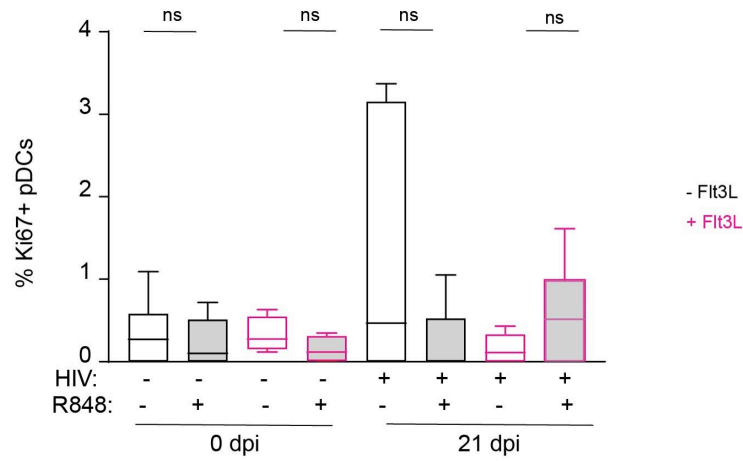


Figure S6 : (Related to Figure 6): No significant proliferation by splenic pDCs from hu-mice treated or not with Flt3L

Splenocytes from uninfected and infected hNSG mice, treated or not with Flt3L, were stimulated with R848 and pDCs were evaluated for nuclear protein Ki67 by flow cytometry. pDCs were identified using the gating strategy shown on Fig S1. There were 10 mice in the uninfected groups and 11 mice in the infected (21 dpi) groups. Statistical analysis: two-tailed Wilcoxon matched-pairs rank test to compare changes in frequency of Ki67+pDC before and after R848 stimulation; ns not significant. See also Figure S1 for gating strategy of pDCs.

Figure S6. No significant proliferation by splenic pDCs from hu-mice treated or not with Flt3L

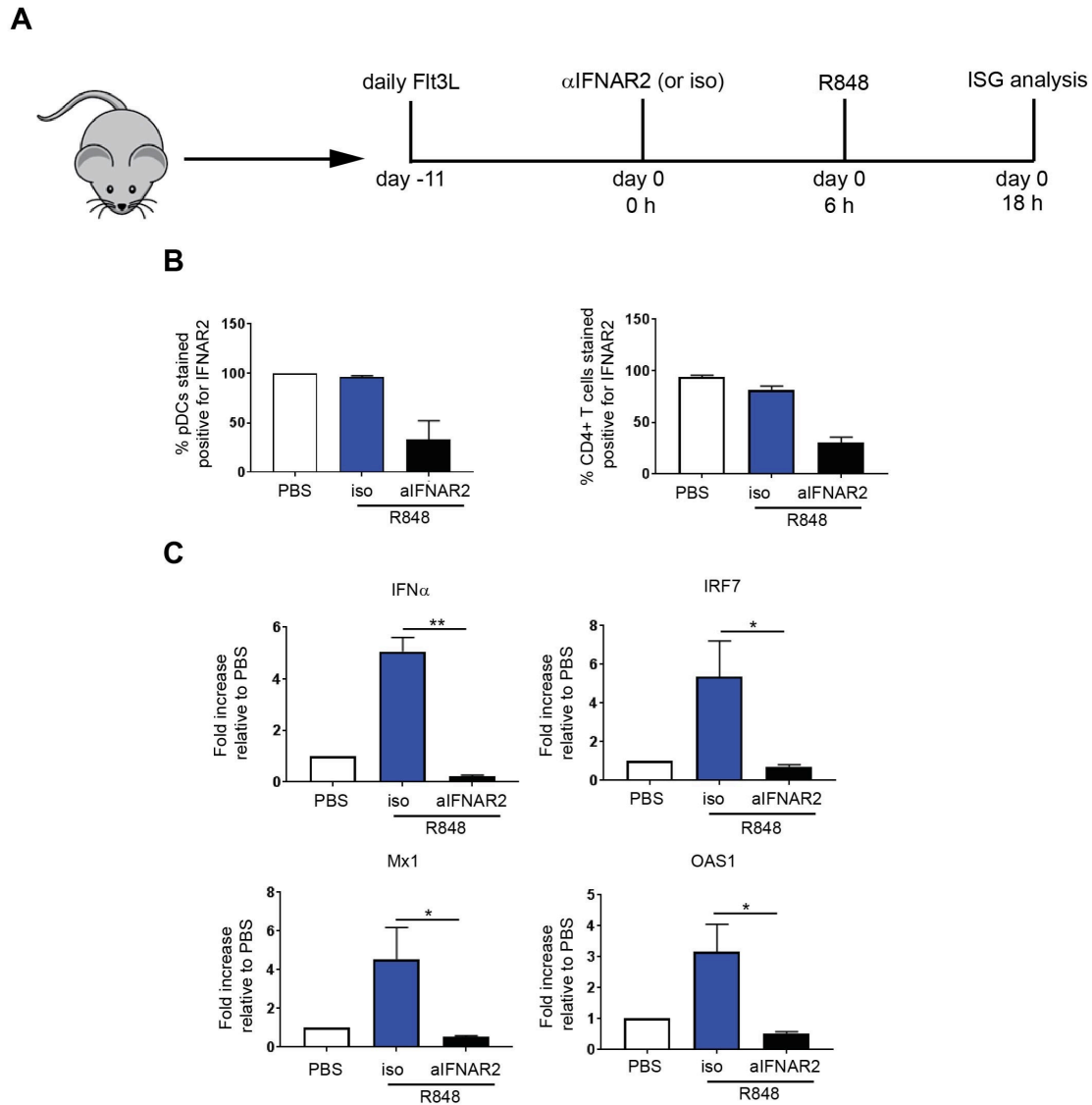


Figure S7. Blocking IFN-I signaling inhibits ISG synthesis in vivo, Related to Figure 7.

(A) hNSG mice treated with Flt3L for 11 days were injected with 100 μ g of anti-IFNAR2 mAb (cloneMMHAR-2) or IgG2a isotype control. Following in vivo stimulation with TLR7/8 agonist R848, (B) efficiency of blocking of IFN-I signalling was examined in splenocytes by flow cytometry using PE-conjugated anti-IFNAR2 mAb of the same clone. Shown are mean (\pm SD) levels of pDCs and CD4+ T cells that were stained positive for IFNAR2. (C) Additionally, mean (\pm SD) mRNA levels of ISG genes were analyzed by quantitative PCR in splenocytes. Gene expression was expressed as fold increase relative to that in PBS-treated mice which was set as 1. Panels B and C had 3-4 mice per group. Statistical analysis: two-tailed Mann-Whitney's tests; * < 0.05; ** < 0.01.

Figure S7. Blocking IFN-I signaling inhibits ISG synthesis in vivo

Supplemental Table 1. Characteristics of humanized mice used in study

Related to all main Figures as well as Figures S2, S3, S4, S5 and S6

Figure	Figure panel	Model	Sum total # of mice in all panels (gender)	Wks post humanization	% hCD45+ cell in blood, median (range)	Wks of infection	Days of Fit3L treatment
1	A and B	NSG	24 (11F, 13M)	17-19	79 (17-93)	3	0
	C and D	BLT	28 (M)	8-9	74 (60-93)	3	0
2	B, D and E	NSG	17 (3F, 14M)	17-22	60 (17-84)	3	32
	C	NSG	10 (5F, 5M)	17	91 (65-94)	3	32
	F	NSG	15 (11F, 4M)	18	53 (37-76)	5	46
	G	BLT	15 (M)	11-14	60 (24-89)	3	32
2 supp	A and B	NSG	43 (29F, 14M)	17	55 (8-94)	0	11
	C	NSG	22 (18F, 4M)	17	75 (45-94)	0	11
3 supp		NSG	10 (9F, 1M)	20	32 (20-61)	3	32
4 supp		NSG	8 (2F, 6M)	17	90 (80-99)	9	45
3		NSG	32 (11F, 21M)	17-22	75 (17-94)	3	32
4		NSG	38 (28F, 10M)	17-22	39 (22-75)	3	36
5 supp	B	NSG	15 (7F, 8M)	17	88 (65-94)	3	36
	C and D	BLT	15 (M)	9	60 (37-93)	3	36
5	A and B	NSG	33 (17F, 16M)	16-17	60 (13-90)	0	11 or 32
	C	NSG	32 (24F, 8M)	17-20	71 (30-94)	0	32
6	HIV-	NSG	20 (8F, 12M)	16-19	56 (14-91)	0	30
	HIV+ 7dpi	NSG	12 (8F, 4M)	16-19	60 (16-83)	1	18
	HIV+ 21dpi	NSG	18 (13F, 5M)	16-19	70 (16-91)	3	32
6 supp		NSG	21 (13F, 8M)	16-19	65 (16-91)	3	32
7	A	NSG	45 (25F, 20M)	17-22	43(22-82)	3	36
	B	NSG	11 (8F, 3M)	17-22	48 (22-88)	3	0
	C	NSG	12 (8F, 4M)	16-19	62 (16-83)	1	18
	D	NSG	12 (F)	17	72 (53-83)	2	24
	E	NSG	18 (10F, 8M)	17-22	69 (25-90)	3	32
7 supp	F	NSG	15 (F)	17	34 (6-78)	1	18
		NSG	10 (M)	20	14 (8-46)	0	11

wks: weeks; M, male; F, female.

Supplemental Table 2: List of Abs used for flow cymetry

Ab against	Manufacturer	Clone	Product number
BDCA1 (hu)	BioLegend	L161	331516
BDCA2 (hu)	BioLegend	201A	354204
BDCA3 (hu)	BioLegend	M80	344110
CD45 (hu)	BioLegend	HI30	304014
CD45 (mouse)	BioLegend	30-F11	103146
CD3 (hu)	BioLegend	UCHT1	300472
CD4 (hu)	BioLegend	OKT4	317428
CD8 (hu)	BioLegend	SK1	344718
CD11c (hu)	BioLegend	3.9	301635
CD14 (hu)	BioLegend	M5E2	301822
CD16 (hu)	BioLegend	3G8	302026
CD19 (hu)	BioLegend	HIB19	302252
CD123 (hu)	BioLegend	6H6	306024
HLA-DR (hu)	BioLegend	L243	307622
IFNAR2 (hu)	PBL Science	MMHAR-2	21385-3
IFN α (hu)	Mitenyi Biotec	LT27:295	130-099-214
p24 (HIV gag)	Beckmann Couter	KC57-FITC	6604665
p24 (HIV gag)	Beckmann Couter	KC57-RD1	6604667

hu, human.

VIII. References

- Anandasabapathy, N., Breton, G., Hurley, A., Caskey, M., Trumfheller, C., Sarma, P., Pring, J., Pack, M., Buckley, N., Matei, I., *et al.* (2015). Efficacy and safety of CDX-301, recombinant human Flt3L, at expanding dendritic cells and hematopoietic stem cells in healthy human volunteers. *Bone Marrow Transplant* 50, 924-930.
- Bam, R.A., Hansen, D., Irrinki, A., Mulato, A., Jones, G.S., Hesselgesser, J., Frey, C.R., Cihlar, T., and Yant, S.R. (2017). TLR7 Agonist GS-9620 Is a Potent Inhibitor of Acute HIV-1 Infection in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Antimicrob Agents Chemother* 61.
- Barratt-Boyes, S.M., Wijewardana, V., and Brown, K.N. (2010). In acute pathogenic SIV infection plasmacytoid dendritic cells are depleted from blood and lymph nodes despite mobilization. *J Med Primatol* 39, 235-242.
- Barron, M.A., Blyveis, N., Palmer, B.E., MaWhinney, S., and Wilson, C.C. (2003). Influence of plasma viremia on defects in number and immunophenotype of blood dendritic cell subsets in human immunodeficiency virus 1-infected individuals. *J Infect Dis* 187, 26-37.
- Bego, M.G., Cote, E., Aschman, N., Mercier, J., Weissenhorn, W., and Cohen, E.A. (2015). Vpu Exploits the Cross-Talk between BST2 and the ILT7 Receptor to Suppress Anti-HIV-1 Responses by Plasmacytoid Dendritic Cells. *PLoS Pathog* 11, e1005024.
- Beignon, A.S., McKenna, K., Skoberne, M., Manches, O., DaSilva, I., Kavanagh, D.G., Larsson, M., Gorelick, R.J., Lifson, J.D., and Bhardwaj, N. (2005). Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J Clin Invest* 115, 3265-3275.
- Biancotto, A., Grivel, J.C., Iglehart, S.J., Vanpouille, C., Lisco, A., Sieg, S.F., Debernardo, R., Garate, K., Rodriguez, B., Margolis, L.B., *et al.* (2007). Abnormal activation and cytokine spectra in lymph nodes of people chronically infected with HIV-1. *Blood* 109, 4272-4279.
- Bjorck, P. (2001). Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-treated mice. *Blood* 98, 3520-3526.
- Bloch, N., O'Brien, M., Norton, T.D., Polsky, S.B., Bhardwaj, N., and Landau, N.R. (2014). HIV type 1 infection of plasmacytoid and myeloid dendritic cells is restricted by high levels of SAMHD1 and cannot be counteracted by Vpx. *AIDS Res Hum Retroviruses* 30, 195-203.

Brown, K.N., Wijewardana, V., Liu, X., and Barratt-Boyes, S.M. (2009). Rapid influx and death of plasmacytoid dendritic cells in lymph nodes mediate depletion in acute simian immunodeficiency virus infection. *PLoS Pathog* 5, e1000413.

Bruel, T., Dupuy, S., Demoulins, T., Rogez-Kreuz, C., Dutrieux, J., Corneau, A., Cosma, A., Cheynier, R., Dereuddre-Bosquet, N., Le Grand, R., *et al.* (2014). Plasmacytoid dendritic cell dynamics tune interferon- α production in SIV-infected cynomolgus macaques. *PLoS Pathog* 10, e1003915.

Cheng, L., Ma, J., Li, J., Li, D., Li, G., Li, F., Zhang, Q., Yu, H., Yasui, F., Ye, C., *et al.* (2017). Blocking type I interferon signaling enhances T cell recovery and reduces HIV-1 reservoirs. *J Clin Invest* 127, 269-279.

Dave, V.P., Hajjar, F., Dieng, M.M., Haddad, E., and Cohen, E.A. (2013). Efficient BST2 antagonism by Vpu is critical for early HIV-1 dissemination in humanized mice. *Retrovirology* 10, 128.

Donaghy, H., Pozniak, A., Gazzard, B., Qazi, N., Gilmour, J., Gotch, F., and Patterson, S. (2001). Loss of blood CD11c(+) myeloid and CD11c(-) plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load. *Blood* 98, 2574-2576.

Folks, T.M., Clouse, K.A., Justement, J., Rabson, A., Duh, E., Kehrl, J.H., and Fauci, A.S. (1989). Tumor necrosis factor α induces expression of human immunodeficiency virus in a chronically infected T-cell clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2365-2368.

Harada, S., Koyanagi, Y., and Yamamoto, N. (1985). Infection of HTLV-III/LAV in HTLV-I-carrying cells MT-2 and MT-4 and application in a plaque assay. *Science* 229, 563-566.

Harper, M.S., Guo, K., Gibbert, K., Lee, E.J., Dillon, S.M., Barrett, B.S., McCarter, M.D., Hasenkrug, K.J., Dittmer, U., Wilson, C.C., *et al.* (2015). Interferon- α Subtypes in an Ex Vivo Model of Acute HIV-1 Infection: Expression, Potency and Effector Mechanisms. *PLoS Pathog* 11, e1005254.

Herbeuval, J.P., Grivel, J.C., Boasso, A., Hardy, A.W., Chougnet, C., Dolan, M.J., Yagita, H., Lifson, J.D., and Shearer, G.M. (2005a). CD4⁺ T-cell death induced by infectious and noninfectious HIV-1: role of type 1 interferon-dependent, TRAIL/DR5-mediated apoptosis. *Blood* 106, 3524-3531.

Herbeuval, J.P., Hardy, A.W., Boasso, A., Anderson, S.A., Dolan, M.J., Dy, M., and Shearer, G.M. (2005b). Regulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand on primary CD4⁺ T cells

by HIV-1: role of type I IFN-producing plasmacytoid dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 13974-13979.

Howell, D.N., Andreotti, P.E., Dawson, J.R., and Cresswell, P. (1985). Natural killing target antigens as inducers of interferon: studies with an immunoselected, natural killing-resistant human T lymphoblastoid cell line. *J Immunol* *134*, 971-976.

Huang, J., Yang, Y., Al-Mozaini, M., Burke, P.S., Beamon, J., Carrington, M.F., Seiss, K., Rychert, J., Rosenberg, E.S., Lichterfeld, M., *et al.* (2011). Dendritic cell dysfunction during primary HIV-1 infection. *J Infect Dis* *204*, 1557-1562.

Ito, T., Kanzler, H., Duramad, O., Cao, W., and Liu, Y.J. (2006). Specialization, kinetics, and repertoire of type 1 interferon responses by human plasmacytoid predendritic cells. *Blood* *107*, 2423-2431.

Kwa, S., Kannanganat, S., Nigam, P., Siddiqui, M., Shetty, R.D., Armstrong, W., Ansari, A., Bosinger, S.E., Silvestri, G., and Amara, R.R. (2011). Plasmacytoid dendritic cells are recruited to the colorectum and contribute to immune activation during pathogenic SIV infection in rhesus macaques. *Blood* *118*, 2763-2773.

Lehmann, C., Jung, N., Forster, K., Koch, N., Leifeld, L., Fischer, J., Mauss, S., Drebber, U., Steffen, H.M., Romerio, F., *et al.* (2014). Longitudinal analysis of distribution and function of plasmacytoid dendritic cells in peripheral blood and gut mucosa of HIV infected patients. *J Infect Dis* *209*, 940-949.

Lepelley, A., Louis, S., Sourisseau, M., Law, H.K., Pothlichet, J., Schilte, C., Chaperot, L., Plumas, J., Randall, R.E., Si-Tahar, M., *et al.* (2011). Innate sensing of HIV-infected cells. *PLoS Pathog* *7*, e1001284.

Li, G., Cheng, M., Nunoya, J., Cheng, L., Guo, H., Yu, H., Liu, Y.J., Su, L., and Zhang, L. (2014). Plasmacytoid dendritic cells suppress HIV-1 replication but contribute to HIV-1 induced immunopathogenesis in humanized mice. *PLoS Pathog* *10*, e1004291.

Li, G., Zhao, J., Cheng, L., Jiang, Q., Kan, S., Qin, E., Tu, B., Zhang, X., Zhang, L., Su, L., *et al.* (2017). HIV-1 infection depletes human CD34+CD38- hematopoietic progenitor cells via pDC-dependent mechanisms. *PLoS Pathog* *13*, e1006505.

Li, H., Gillis, J., Johnson, R.P., and Reeves, R.K. (2013). Multi-functional plasmacytoid dendritic cells redistribute to gut tissues during simian immunodeficiency virus infection. *Immunology* *140*, 244-249.

Li, Q., Estes, J.D., Schlievert, P.M., Duan, L., Brosnahan, A.J., Southern, P.J., Reilly, C.S., Peterson, M.L., Schultz-Darken, N., Brunner, K.G., *et al.* (2009). Glycerol monolaurate prevents mucosal SIV transmission. *Nature* *458*, 1034-1038.

Lodge, R., Lalonde, J.P., Lemay, G., and Cohen, E.A. (1997). The membrane-proximal intracytoplasmic tyrosine residue of HIV-1 envelope glycoprotein is critical for basolateral targeting of viral budding in MDCK cells. *EMBO J* *16*, 695-705.

Macal, M., Jo, Y., Dallari, S., Chang, A.Y., Dai, J., Swaminathan, S., Wehrens, E.J., Fitzgerald-Bocarsly, P., and Zuniga, E.I. (2018). Self-Renewal and Toll-like Receptor Signaling Sustain Exhausted Plasmacytoid Dendritic Cells during Chronic Viral Infection. *Immunity* *48*, 730-744 e735.

Marsden, M.D., and Zack, J.A. (2017). Humanized Mouse Models for Human Immunodeficiency Virus Infection. *Annu Rev Virol* *4*, 393-412.

Masten, B.J., Olson, G.K., Kusewitt, D.F., and Lipscomb, M.F. (2004). Flt3 ligand preferentially increases the number of functionally active myeloid dendritic cells in the lungs of mice. *J Immunol* *172*, 4077-4083.

Melkus, M.W., Estes, J.D., Padgett-Thomas, A., Gatlin, J., Denton, P.W., Othieno, F.A., Wege, A.K., Haase, A.T., and Garcia, J.V. (2006). Humanized mice mount specific adaptive and innate immune responses to EBV and TSST-1. *Nat Med* *12*, 1316-1322.

Nganou-Makamdop, K., Billingsley, J.M., Yaffe, Z., O'Connor, G., Tharp, G.K., Ransier, A., Laboune, F., Matus-Nicodemos, R., Lerner, A., Gharu, L., *et al.* (2018). Type I IFN signaling blockade by a PASylated antagonist during chronic SIV infection suppresses specific inflammatory pathways but does not alter T cell activation or virus replication. *PLoS Pathog* *14*, e1007246.

O'Brien, M., Manches, O., and Bhardwaj, N. (2013). Plasmacytoid dendritic cells in HIV infection. *Adv Exp Med Biol* *762*, 71-107.

O'Brien, M., Manches, O., Sabado, R.L., Baranda, S.J., Wang, Y., Marie, I., Rolnitzky, L., Markowitz, M., Margolis, D.M., Levy, D., *et al.* (2011). Spatiotemporal trafficking of HIV in human plasmacytoid dendritic cells defines a persistently IFN- α -producing and partially matured phenotype. *J Clin Invest* *121*, 1088-1101.

Platt, E.J., Wehrly, K., Kuhmann, S.E., Chesebro, B., and Kabat, D. (1998). Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 72, 2855-2864.

Pulendran, B., Banchereau, J., Burkeholder, S., Kraus, E., Guinet, E., Chalouni, C., Caron, D., Maliszewski, C., Davoust, J., Fay, J., *et al.* (2000). Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. *J Immunol* 165, 566-572.

Reeves, R.K., Evans, T.I., Gillis, J., Wong, F.E., Kang, G., Li, Q., and Johnson, R.P. (2012). SIV infection induces accumulation of plasmacytoid dendritic cells in the gut mucosa. *J Infect Dis* 206, 1462-1468.

Sabado, R.L., O'Brien, M., Subedi, A., Qin, L., Hu, N., Taylor, E., Dibben, O., Stacey, A., Fellay, J., Shianna, K.V., *et al.* (2010). Evidence of dysregulation of dendritic cells in primary HIV infection. *Blood* 116, 3839-3852.

Saidi, H., Bras, M., Formaglio, P., Melki, M.T., Charbit, B., Herbeuval, J.P., and Gougeon, M.L. (2016). HMGB1 Is Involved in IFN- α Production and TRAIL Expression by HIV-1-Exposed Plasmacytoid Dendritic Cells: Impact of the Crosstalk with NK Cells. *PLoS Pathog* 12, e1005407.

Sandler, N.G., Bosinger, S.E., Estes, J.D., Zhu, R.T., Tharp, G.K., Boritz, E., Levin, D., Wijeyesinghe, S., Makamdop, K.N., del Prete, G.Q., *et al.* (2014). Type I interferon responses in rhesus macaques prevent SIV infection and slow disease progression. *Nature* 511, 601-605.

Swiecki, M., and Colonna, M. (2015). The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 15, 471-485.

Swiecki, M., Wang, Y., Vermi, W., Gilfillan, S., Schreiber, R.D., and Colonna, M. (2011). Type I interferon negatively controls plasmacytoid dendritic cell numbers in vivo. *J Exp Med* 208, 2367-2374.

Vanderford, T.H., Slichter, C., Rogers, K.A., Lawson, B.O., Obaede, R., Else, J., Villinger, F., Bosinger, S.E., and Silvestri, G. (2012). Treatment of SIV-infected sooty mangabeys with a type-I IFN agonist results in decreased virus replication without inducing hyperimmune activation. *Blood* 119, 5750-5757.

Vandergeeten, C., Fromentin, R., Merlini, E., Lawani, M.B., DaFonseca, S., Bakeman, W., McNulty, A., Ramgopal, M., Michael, N., Kim, J.H., *et al.* (2014). Cross-clade ultrasensitive PCR-based assays to measure HIV persistence in large-cohort studies. *J Virol* 88, 12385-12396.

Webster, B., Werneke, S.W., Zafirova, B., This, S., Coleon, S., Decembre, E., Paidassi, H., Bouvier, I., Joubert, P.E., Duffy, D., *et al.* (2018). Plasmacytoid dendritic cells control dengue and Chikungunya virus infections via IRF7-regulated interferon responses. *Elife* 7.

Wimmers, F., Subedi, N., van Buuringen, N., Heister, D., Vivie, J., Beeren-Reinieren, I., Woestenenk, R., Dolstra, H., Piruska, A., Jacobs, J.F.M., *et al.* (2018). Single-cell analysis reveals that stochasticity and paracrine signaling control interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells. *Nat Commun* 9, 3317.

Zhang, Z., Cheng, L., Zhao, J., Li, G., Zhang, L., Chen, W., Nie, W., Reszka-Blanco, N.J., Wang, F.S., and Su, L. (2015). Plasmacytoid dendritic cells promote HIV-1-induced group 3 innate lymphoid cell depletion. *J Clin Invest* 125, 3692-3703.

Zhen, A., Rezek, V., Youn, C., Lam, B., Chang, N., Rick, J., Carrillo, M., Martin, H., Kasparian, S., Syed, P., *et al.* (2017). Targeting type I interferon-mediated activation restores immune function in chronic HIV infection. *J Clin Invest* 127, 260-268.

CHAPITRE 3 - DEUXIÈME ARTICLE

I. Mise en contexte

Les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) sont dérivées de cellules de peau ou de sang qui ont été reprogrammées à un stade pluripotent embryonnaire et qui permet alors leur différenciation en tout types de cellules humaines nécessaire à des fins thérapeutiques. Le développement de ces cellules a ainsi permis une grande avancée dans le domaine de la médecine régénérative. Cependant, la formation de tératome est l'une des limites majeures de l'utilisation des iPSC. En effet, lorsqu'injectées dans des souris immunodéficientes, même en petites quantités, les iPSCs forment ces tératomes, qui présentent donc un risque important quant aux applications potentielles de ces cellules en clinique. En revanche, aucune étude jusqu'à présent ne s'est intéressée au développement de ces tératomes en présence d'un système immunitaire compétent humain chez la souris immunodéficiente. Pour répondre à cette question, la présente étude a utilisé des souris humPBMC ainsi que des souris BLT pour comparer la probabilité de développement de tératomes en présence d'un système immunitaire autologue. Les iPSC ont donc été dérivées de fibroblastes humains issus soit de biopsie de peau (pour le modèle humPBMC) soit de foie fœtal humain (pour le modèle BLT). Plus précisément, les rôles des cellules NK, absente dans le modèle BLT, et des cellules T a été étudiés ici pour comprendre leur influence dans la formation du tératome.

Le détail de tous ces travaux est décrit dans l'article *NK cells prevent the formation of teratomas derived from human induced pluripotent stem cells* par Basma Benabdallah, Cynthia Deslauniers-Langevin, Chloe Colas, Yuanyi Li, Jean V. Guimond, Elie Haddad et Christian Beausejour et qui est en cours de révision dans la revue *Frontiers in Immunology*.

J'ai produit toutes les souris humanisées utilisées dans ces expériences, j'ai vérifié leur bonne reconstitution par cytométrie de flux avant de les donner au laboratoire utilisateur. La production de ces souris en soi est passée par une longue phase de prise en main et d'optimisation de leur protocole de production, qui nous a donc permis d'en fournir en bien plus grande quantité au fur et à mesure du temps.

NK cells prevent the formation of teratomas derived from human induced pluripotent stem cells

Basma Benabdallah¹, Cynthia Désaulniers-Langevin¹, Chloé Colas¹, Yuanyi Li¹, Guy Rousseau^{2,5}, Jean V. Guimont³, Elie Haddad^{1,4} and Christian Beauséjour^{1,5,*}

¹ Centre de recherche du CHU Ste-Justine, Montréal, Québec, Canada

² Centre de recherche du CIUSSS du Nord-de-Île-de Montréal, Montréal, Québec, Canada

³ CIUSSS du Centre-Sud-de-l'Ile-de-Montréal, Québec, Canada

⁴ Département de Pédiatrie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Québec, Canada

⁵ Département de pharmacologie et physiologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Québec, Canada

* Correspondance:

Christian Beauséjour PhD

CHU Ste-Justine, 3175 Côte Sainte-Catherine

Montréal, Québec, Canada, H3T 1C5

(Phone) 514-345-4931 x4385

e-mail: c.beausejour@umontreal.ca

Running head: Immunogenicity of iPSCs in humanized mice

Total number of figures: 4

II. Abstract

The safe utilization of induced pluripotent stem cell-derivatives in clinic is tributary to the complete elimination of the risk of forming teratomas after transplantation. The extent by which such a risk exists in immune competent hosts is mostly unknown. Here, using humanized mice reconstituted with fetal hematopoietic stem cells and autologous thymus tissue (Hu-BLT) or following the adoptive transfer of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) (Hu-AT), we evaluated the capacity of immune cells to prevent or eliminate teratomas derived from human induced pluripotent stem cells (hiPSCs). Our results showed that the injection of hiPSCs failed to form teratomas in Hu-AT mice reconstituted with allogeneic or autologous PBMCs or purified NK cells alone. However, teratomas were observed in Hu-AT mice reconstituted with autologous PBMCs depleted from NK cells. In line with these results, Hu-BLT which do not have functional NK cells could not prevent the growth of teratomas. Finally, we found that established teratomas were not targeted by NK cells and instead were efficiently rejected by allogeneic but not autologous T cells in Hu-AT mice. Overall, our findings suggest that autologous hiPSC-derived therapies are unlikely to form teratomas in the presence of NK cells.

Words: 193

Key words: iPSC, humanized mice, adoptive transfer, NK cells and T cells

III. Introduction

The potential of regenerative medicine is greatly enhanced by the development of induced pluripotent stem cells (iPSCs). Yet, the risk of forming teratomas using iPSC-derived cell grafts could compromise their clinical use. Indeed, the injection of only a few hundred human embryonic cells was sufficient to form a teratoma in immunodeficient mice [1]. To prevent the formation of teratomas, small molecules able to selectively and efficiently kill pluripotent cell by inhibiting antiapoptotic factors were developed [2; 3]. However, the need for pluripotent stem cells to evade immune responses may be required for the growth of teratomas *in vivo*. Indeed, Zhao and colleagues were the first to observe that mouse iPSCs, but not embryonic stem cells (ESCs), are immunogenic and fail to form teratomas when injected subcutaneously in syngeneic recipients [4]. A response they showed was dependent on the abnormal overexpression of immunogenic genes in iPSCs and on the presence of antigen presenting cells at the injection site [4; 5]. However, pioneer work by Dressel and colleagues showed that mouse iPSCs can give rise to teratomas in autologous/syngeneic mice in absence of the activation of the host natural killer (NK) cells [6; 7]. Likewise, human iPSCs were shown to be the target of human NK cells *in vitro* [8; 9]. Yet, the *in vivo* contribution of the innate immunity, particularly the role of NK cells on the tumorigenic potential of hiPSCs, remains unknown. Here, we used two different models of humanized mice: Hu-Bone-Liver-Thymus (BLT) mice generated by the co-transplantation of fetal liver hematopoietic stem cells along with autologous human thymus tissues that allows for the development and maturation of competent human T cells, and Hu-AT mice reconstituted following the adoptive transfer (AT) of adult peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), and demonstrate that teratoma formation by human iPSCs is abolished only in the presence of NK cells and that this NK-specific cytotoxicity is lost upon the differentiation of hiPSCs.

IV. Results

NK cells prevent the formation of hiPSC-derived teratomas in Hu-AT mice

To investigate if immune cells could protect against the formation of hiPSC-derived teratomas, we first generated hiPSC clones from skin fibroblasts or PBMCs collected from different donors (see table 2 in the supplementary file) using an integration-free (Sendai virus) approach. We confirmed that these clones had normal karyotypes, expressed the classical markers of pluripotency and were able of forming the three germ layers in NSG immunodeficient mice (Figure S1A and S1B and data not shown). We then injected various hiPSC clones under the renal capsule of NSG mice and determined if the adoptive transfer of 1×10^7 PBMCs could prevent the formation of teratomas (Figure 1A). Our results show that practically no teratomas were found (1/13) after the adoptive transfer of autologous or allogeneic PBMCs (Figure 1B). In comparison, 10/12 teratomas formed in absence of the injection of PBMCs. To better define the role of T and NK cells in this process, we repeated the experiment using either NK-depleted PBMCs or purified NK cells (Figure S2). We found that hiPSCs efficiently formed teratomas (7/7) in the presence of autologous PBMCs depleted from NK cells. This was in contrast to when mice were injected with allogeneic NK-depleted PBMCs, in which case teratomas were rejected (0/7). This can be explained if in the absence of NK cells, hiPSCs were allowed to grow into teratomas and that differentiated cells were then rejected by allogeneic T cells. Intriguingly, we observed that mice injected with NK-depleted PBMCs had larger teratomas compared to those grown in immunodeficient mice (Figure 1C). We speculate that their enhanced growth was fueled by human cytokines secreted by autologous PBMCs. Importantly, our results also show that the injection of purified NK cells ($5\text{-}15 \times 10^5$) was able to prevent the formation of hiPSC-derived teratomas (0/17) in both autologous and allogeneic settings (Figure 1B). This confirms that NK cells, but not autologous T cells, are efficient in preventing the development of hiPSC-derived teratomas.

hiPSCs are targeted by NK but not T cells *in vitro*

To confirm our results on the cytotoxicity of T and NK cells towards hiPSCs in Hu-AT mice, we next performed *in vitro* assays of T and NK cell responses against autologous or allogeneic hiPSCs. We observed that while hiPSCs were the target of NK cells, they were unable to

activate T cells (Figures 2A-D). This suggests that hiPSCs are prone to NK but not to T cell killing, an effect that could be mediated by the presence of NK activating receptors and low expression of HLA-I and costimulatory molecules at the surface of hiPSCs (Figure S1C).

hiPSCs efficiently form teratomas in Hu-BLT mice lacking functional NK cells

To further investigate the role of NK cells in the development of hiPSC-derived teratomas, we then injected hiPSCs under the renal capsule of fully reconstituted Hu-BLT mice generated after the transplantation of fetal CD34 cells and thymus tissue fragments (Figure 3A). Hu-BLT mice are known to support reconstitution, maturation, and selection of T cells, but lack functional NK cells (Figure S3) [11]. Consistent with our findings in Hu-AT mice, our results show that the growth of autologous hiPSC-derived teratomas was not significantly hampered in Hu-BLT mice (8/8 in NSG mice vs 8/12 in Hu-BLT mice, see Figure 3B). However, teratomas formed in Hu-BLT mice (5/6) injected with autologous immune cells were found infiltrated with low level, non-randomly distributed T cells with no significant sign of apoptosis (Figure 3C), supporting the findings of Zhao and colleagues [12]. Out of the five teratomas that formed in autologous Hu-BLT mice, only one was bigger in size when compared to those formed in NSG mice (data not shown). This oversized teratoma was observed in the mouse that had the highest level of circulating hCD45 immune cells (78% vs 63% on average for the others) which may have contributed to the increased growth. Surprisingly, when hiPSCs were injected in Hu-BLT mice reconstituted with allogeneic immune cells, three out six teratomas were not totally rejected (Figure 3B). However, the fact that these three remaining teratomas were massively infiltrated by T cells and undergoing high levels of apoptosis suggests that they would have been eventually eliminated as observed when using allogeneic Hu-AT mice (Figure 3C).

NK cells fail to reject established teratomas

We then hypothesised that the protection against the formation of teratomas conferred by NK cells was tributary to the undifferentiated nature of iPSCs (i.e. low HLA-I expression as shown in Fig S1C) which is known to favor the activation of NK cells. To test this hypothesis, we repeated the above-described experiment but this time we proceeded to the adoptive transfer of

immune cells only six weeks after the injection of hiPSCs, a time at which teratomas had already started to grow and cells to differentiate (Figure 4A). While we found that allogeneic PBMCs or NK-depleted PBMCs were capable of rejecting teratomas (1/7 and 1/8 respectively), autologous PBMCs and purified NK cells were not (6/8 and 7/8 respectively, see Figure 4B). Analysis of the teratomas upon sacrifice showed a massive T cell infiltration and apoptosis in the remaining allogeneic teratomas (Figure 4C). In comparison, only a few T cells were found in autologous teratomas. As expected, very few NK cells were found in growing teratomas, suggesting these cells lose their ability to recognize differentiated hiPSC-derived cells. This is supported by the fact that while hiPSCs expressed very low levels of HLA-I expression, these levels were found much higher within only a few hours after the cells were placed in presence of serum *in vitro* (Figure S4). Overall, these results indicate that NK cells are very effective at preventing the formation of a teratoma from hiPSCs, but lose this capacity against differentiated cells.

V. Discussion

The ability to generate hiPSCs at an affordable cost and in a timely manner will be necessary to assure the success of future hiPSC-derived cell therapies. Moreover, it will be essential to demonstrate that hiPSC-based therapies, whether using autologous donors or through the development of universal cell lines, are safe [13; 14; 15]. Using two distinct humanized mouse models, we here provide evidences that human iPSCs are the target of NK cells *in vitro* and *in vivo*. In opposition to what was found using murine iPSCs, human NK cells could prevent the formation of teratomas without prior activation [7]. Other than the species differences, such disparity may be explained by the use of a different injection site in our study (renal capsule versus subcutaneous) and perhaps by the high expression level of NK activating ligands (i.e. MICA/B) in hiPSCs. Another explanation may be that immune cells, including NK cells, may have been already partially or fully activated from their injection into NSG mice, which are known to gradually develop severe graft versus host disease (GvHD) following the injection of human PBMCs. Our results also showed that in absence of NK cells, teratomas from allogeneic but not autologous hiPSCs were rejected by T cells in both Hu-AT and Hu-BLT mice. Moreover we found that inhibition of teratoma formation was possible only if hiPSCs were injected prior to the adoptive transfer of total PBMCs or purified NK cells. In addition, in the absence of recombinant human IL-15 to support the proliferation of NK in our mice [16], our results also suggest that the relatively low number of NK cells injected during the adoptive transfer procedure was sufficient to prevent the growth of teratomas. These results suggest that if immunosuppressive drugs were to be used to increase engraftment of iPSC-derived cells, it would be very important to insure no inhibition of the NK cell compartment to lower the risk of forming a teratoma.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the flow cytometry platform, humanized mice platform and animal facility for providing technical support and to Renée Dicaire for handling clinical samples. This work was supported by a grant from the Canadian Institute of Health Research #MOP-126096 to C.M.B. and E. H. by a grant from le réseau ThéCell du Fonds de la recherche du Québec – Santé

(FRQS) and the support from la Fondation Charles Bruneau for access to technological platforms. C.M.B. was supported by a senior scientist award from the FRQS. This manuscript has been released as a Pre-Print at bioRxiv: <http://biorxiv.org/cgi/content/short/714170v1>

AUTHOR CONTRIBUTIONS

B.B., C.D.L., C.C. and Y.L. performed experiments. G.R. performed statistical analysis. B.B., H.E. and C.B. designed the studies, J.V.G. provided cells. B.B. and C.B. wrote the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no competing interests

VI. Materials and Methods

Humanized mice

NOD/SCID/IL2R γ null (NSG) mice were obtained from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) and housed in the animal care facility at the CHU Sainte-Justine Research Center under pathogen-free conditions in sterile ventilated racks. All *in vivo* manipulations were previously approved by the institutional committee for good laboratory practices for animal research (protocol #579). Bone-liver-thymus humanized mice (Hu-BLT) were generated as previously described [10]. Briefly, six week-old NSG mice were first irradiated with 2 Gy total body irradiation (1 Gy/min using a Faxitron CP-160) and implanted with small pieces (1-2 mm³) of human fetal thymus under the renal capsule followed by the intravenous delivery of 1×10^7 CD34⁺ hematopoietic stem cells isolated from autologous fetal liver. Fetal tissues were obtained from consented healthy donors after surgical abortion at around week 20 of pregnancy. Human immune cell engraftment in humanized mice was monitored in peripheral blood until 13 weeks post-reconstitution. Leukocytes were labeled with conjugated antibodies for human PerCP-Cy5.5-CD45, APC-CD3, PE-CD19, and FITC-CD4 (see Table 1 in the supplementary file for a complete list of antibodies used) and analyzed by flow cytometry (BD FACSCANTO II, BD Biosciences). For adoptive transfer experiments (Hu-AT), human adult blood was collected and immune cells purified by Ficoll (GE healthcare). Mice were injected intravenously with 1×10^7 freshly isolated PBMCs or NK-depleted PBMCs obtained from the negative fraction of a positive selection (CD56⁺) kit (catalog #17855 from STEMCELL Technologies). Alternatively, mice were injected with $5-15 \times 10^5$ NK cells purified using the NK cell enrichment negative selection kit (catalog #19055 from STEMCELL Technologies).

Generation and characterization of hiPSCs

PBMCs or fibroblasts obtained either from human fetal liver tissues or human adult skin were isolated after collagenase dissociation and reprogrammed into iPSCs with the integration-free based Sendai virus (Cytotune 2.0 kit from Life Technologies). Fibroblasts were used at low population doubling (less than 5) to insure high efficiency of reprogramming. Emerging hiPSC colonies were manually picked and cultured under feeder-free conditions in Essential 8 medium on Geltrex-coated dishes (Life Technologies). hiPSC clones were maintained in Essential 8 Flex

medium in feeder-free conditions and passaged at least 15 times to increase stable pluripotency. hiPSC generation and characterization were done in the iPSC – cell reprogramming core facility of CHU Sainte-Justine. hiPSC colonies were stained with antibodies for anti-human SSEA-4, Sox2, OCT4 and TRA1-60 overnight at 4°C using the pluripotent Stem Cell 4-Marker Immunocytochemistry Kit (catalog # A24881 from Life Technologies), followed by incubation with an ALEXA secondary antibodies for 30 minutes at room temperature. Nuclei were counterstained with DAPI. Karyotypes were produced by G-banding and analyzed by the CHU Ste-Justine cytogenetic department.

Flow cytometry-based phenotypic characterization

Parental fibroblasts and their derived hiPSCs colonies were cultured in E8 Flex medium and dissociated in a single cell suspension using TrypLE (Life Technologies) and characterized by flow cytometry (BD LSRFortessa, BD Biosciences) for their expression of the human leukocyte antigen-I (HLA-I), the three common costimulatory molecules (CD80, CD83 and CD86) and ligands for NK cell stimulatory receptors (MICA/B and CD112/CD155 (see Table 1 in the supplementary file for a complete list of antibodies used).

T cell activation and proliferation assays

Human PBMCs were freshly isolated from healthy donors peripheral blood using Ficoll-Paque. Effector cells were then co-cultured with either autologous or allogeneic iPSCs at 1:2 ratio during three days for T cell activation or five days for T cell proliferation at 37°C. T cell activation was measured with a PE-conjugated anti-hCD69 (Biolegend) on CD3⁺ gated viable cells by flow cytometry (BD LSRFortessa, BD Biosciences). For T cell proliferation, PBMCs were first stained using the CellTrace CFSE kit to monitor distinct generations of viable proliferating CD3⁺ T cells by dye dilution (Catalog # C34570 from Invitrogen) before being co-cultured with iPSCs. Effector cells without stimulation were used as a negative control and an anti-CD3 (OKT3) (Biolegend) antibody were used as positive control. 7-AAD (BD Biosciences) was used to exclude dead cells.

NK cell degranulation and cytotoxicity assays

Freshly purified NK cells (as described above) were incubated with or without target cells at the indicated ratios. K562 cells were used as a positive control in all experiments. For the NK cell degranulation assay, effector and target cells were co-cultured at 1:2 ratio in the presence of FITC-conjugated anti-human CD107a/b (BD Biosciences) for one hour at 37°C, then 2µl/ml of monensin (catalog # 554724 from BD Biosciences) was added to the cell mixture for an additional three hours of incubation. For cytotoxicity assay, effector and PKH26-stained target cells were mixed at 1:1 or 5:1 ratio and incubated for four hours at 37°C. At the end of the incubation, degranulation was quantified by flow cytometry (BD LSRFortessa, BD Biosciences) after gating on CD3-/CD56+/CD107+ viable cells and the extent of cytotoxicity was determined by the relative number of live target cells labelled with PKH26 only and dead cells labelled with both PKH26 (catalog # PKH26GL-1KT from Sigma-Aldrich) and 7-AAD (BD Biosciences).

Teratoma formation

Approximately 1×10^6 hiPSCs were first detached in cell clumps using the gentle cell dissociation reagent (STEMCELL Technologies) and resuspended in cold PBS containing 50% of Geltrex and kept on ice. Cell mixture was then injected unilaterally under the renal capsule of mice. Eight weeks later, teratomas were dissected out and placed in OCT. Cryosections were stained with hematoxylin eosin for histological analysis, or immunostained with antibodies against human CD4, CD8 (Biolegend), NKp46 (R&D Systems) and TUNEL (catalog # 1684795910 from Roche).

Statistical Analysis

GraphPad Prism 8 software was used for statistical analysis; p values on multiple comparisons were calculated using Student's t-Test. Alternatively, Chi-square analysis was performed to determine if the presence of teratoma formation was significantly different between conditions. First we have performed an overall Chi-square analysis followed, when $p < 0.05$, by a two-by-two comparison for which p-value was adjusted using Bonferroni correction for the number of comparisons. The analysis were performed using SPSS (version 25) and $p < 0.05$ was considered significant.

VII. Figures

VII.1. Main figures

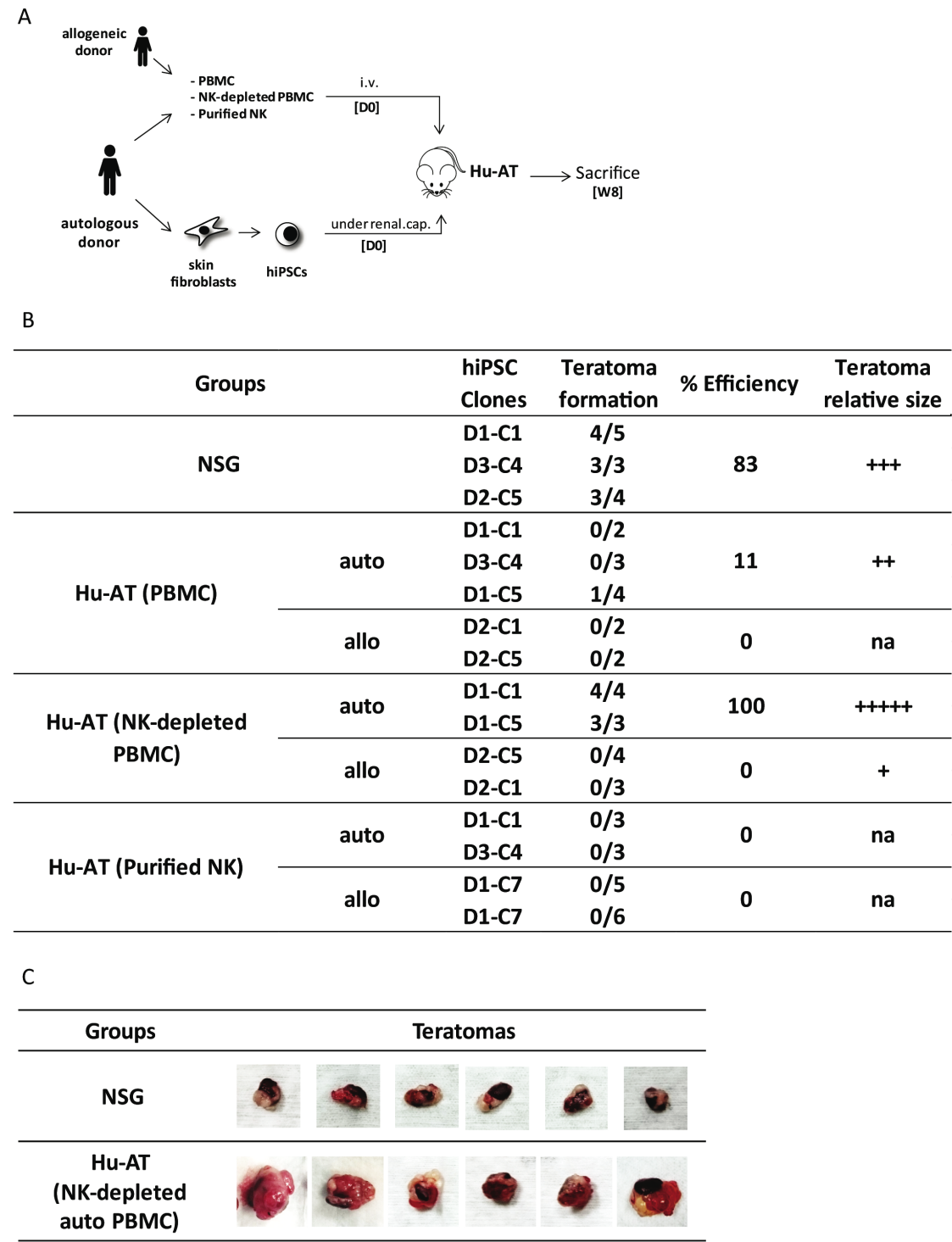


Figure 1. Injection of NK cells is sufficient to prevent the formation of hiPSC-derived teratomas in Hu-AT mice.

(A) Experimental design and timeline of the injection of hiPSCs in Hu-AT mice. PBMCs (1×10^7), NK-depleted PBMCs (1×10^7) or purified NK cells ($5\text{--}15 \times 10^5$) were injected intravenously at day 0 (DO) to generate Hu-AT mice. Approximately 1×10^6 autologous or allogeneic hiPSCs were injected under the renal capsule on the same day (one injection per mouse). Teratoma formation was evaluated upon sacrifice eight weeks after the injection of cells. (B) Incidence of teratoma formation in the renal capsule of Hu-AT mice. Shown is the proportion of teratomas derived from the indicated hiPSC clones. A significant overall difference was observed between the different conditions ($\chi^2(6)=44.28$, $p < 0.05$). Further analysis reveals a significant difference between NSG and all Hu-AT conditions ($p < 0.05$) and between Hu-AT (NK-depleted PBMCs) autologous vs. allogeneic ($p < 0.05$). No other significant difference was detected. Of note, allogeneic D1-C7 are listed twice as they were used in Hu-AT mice from two independent experiments using NK cells from two different donors. (C) Representative photos showing the increased size of teratomas isolated from NSG mice previously injected with NK-depleted autologous PBMCs compared to control NSG non-reconstituted mice.

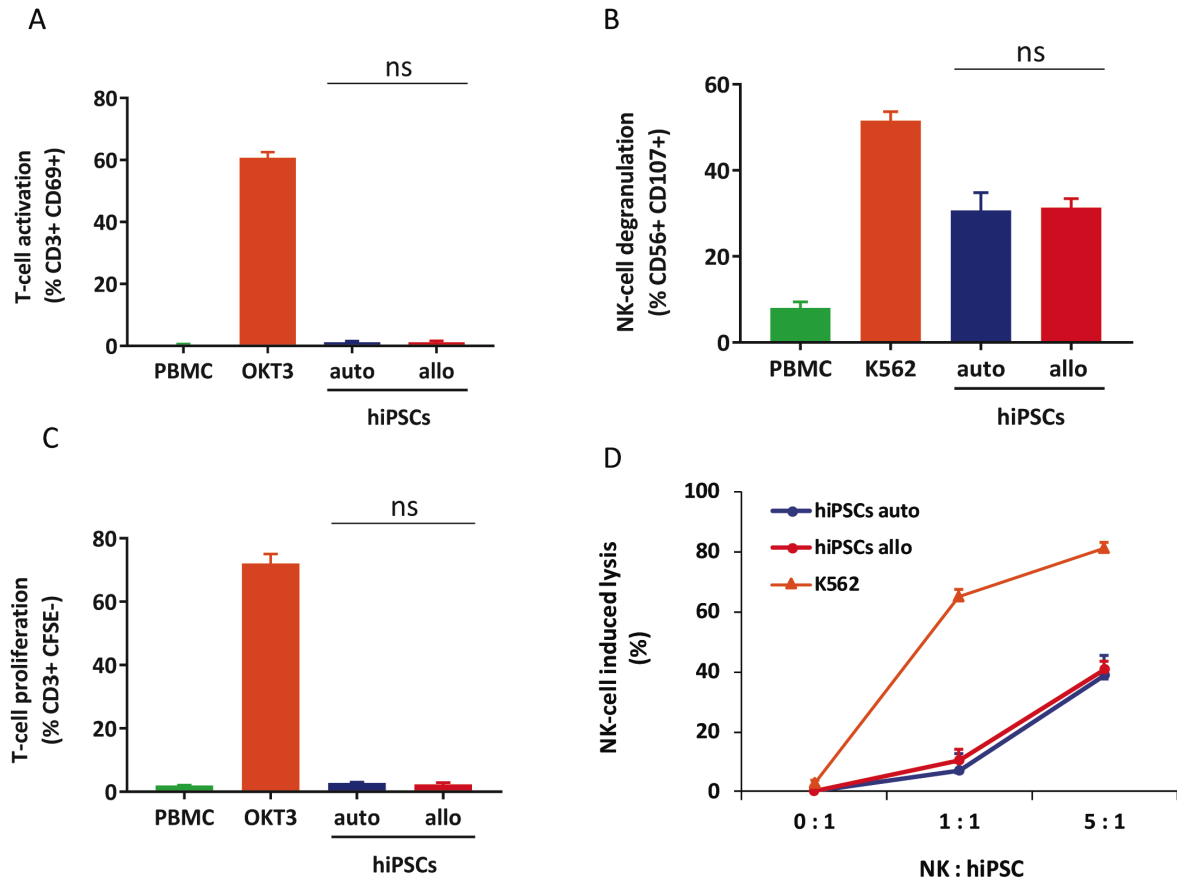
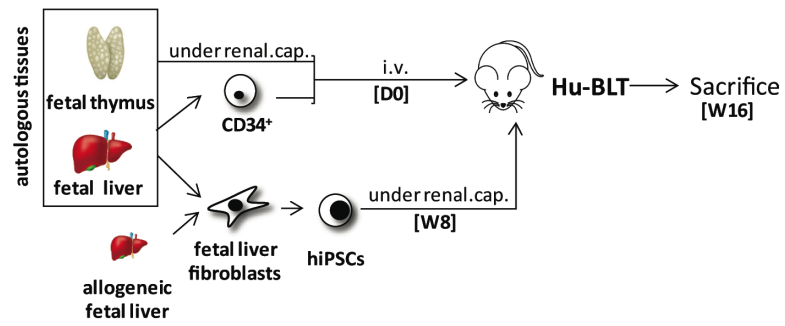


Figure 2. hiPSCs are the target of NK but not T cells *in vitro*.

(A) Measures of T cell activation (as determined by gating for CD3⁺/CD69⁺ cells) after co-culture of hiPSCs with autologous or allogeneic PBMCs for three days. PBMCs alone were used as a negative control and PBMCs treated with OKT3 were used as a positive control. Shown is the mean \pm SEM of $n = 4$ from two independent experiments using effector cells collected from two different donors each time. (B) Measures of T cell proliferation (as determined by gating for CD3⁺/CFSE⁺ cells) after co-culture of hiPSCs with autologous or allogeneic CFSE-stained PBMCs for five days. PBMCs alone were used as a negative control and PBMCs treated with OKT3 were used as a positive control. Shown is the mean \pm SEM of $n = 4$ from two independent experiments using effector cells collected from two different donors each time. (C) hiPSCs induce degranulation of NK cells *in vitro*. Degranulation was determined by evaluating CD107 expression on gated CD3⁺/CD56⁺ NK cell populations after a four hour co-culture between freshly isolated PBMCs and autologous or allogeneic hiPSCs (ratio 1:2). PBMCs alone

were used as a negative control and PBMCs co-cultured with K562 cells were used as a positive control. Shown is the mean \pm SEM of $n = 4$ from two independent experiments using effector cells collected from two different donors each time. **(D)** Autologous and allogeneic hiPSCs are lysed by purified NK cells *in vitro*. Cell lysis was determined by flow cytometry with the absolute count of PKH26-stained hiPSCs after a 4 hour co-culture with NK cells purified by magnetic negative selection. NK cells alone were used as a negative control and NK cells co-cultured with K562 cells were used as a positive control. Shown is the mean \pm SEM of $n = 4$.

A



B

Groups		hiPSC Clones	Teratoma formation	% Efficiency	T cell infiltration
NSG		D4	4/4	100	na
		D1-C1	4/4		
Hu-BLT	auto	D4	5/6	83	+
	allo	D1-C1	2/2	50	++++
		D1-C1	1/4		

C

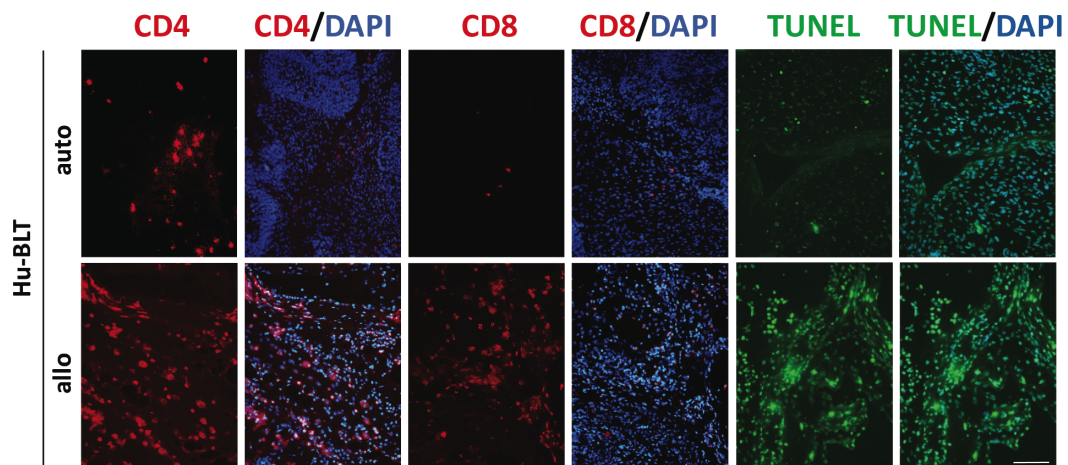
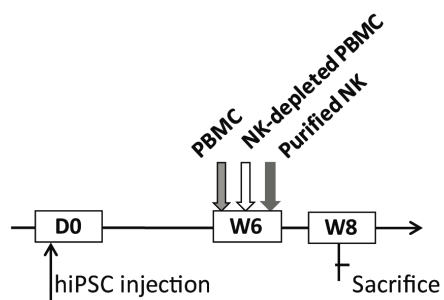


Figure 3. hiPSCs efficiently develop into teratomas in Hu-BLT mice lacking functional NK cells.

(A) Experimental design and timeline of the injection of hiPSCs in Hu-BLT mice. Hu-BLT mice were generated by the injection of fetal tissues as previously described and immune reconstitution allowed for eight weeks (W8) prior from the injection of approximately 1×10^6 hiPSCs under the renal capsule. hiPSCs were derived from fetal liver fibroblasts autologous or allogeneic to CD34 positive hematopoietic cells. Teratomas were allowed to grow for eight weeks before mice were sacrificed at week 16 (W16). **(B)** Incidence of teratoma formation in the renal capsule of Hu-BLT mice. Shown is the proportion of teratomas derived from the indicated hiPSC clones and their relative infiltration with T cells. No significant difference was observed between conditions (χ^2 (2)=5.42, $p = 0.067$) in spite of a clear trend. Of note, allogeneic D1-C1 are listed twice as they were used in Hu-BLT mice reconstituted with cells and thymus tissue obtained from two different donors. na = not applicable. + indicates low level of infiltration, ++++ indicates high level of infiltration. **(C)** Representative photos showing the infiltration of CD4⁺ and CD8⁺ T cells (in red) and apoptosis (as determined by TUNEL in green) in sections of allogeneic and autologous teratomas collected from Hu-BLT mice. DAPI staining was performed to visualize nuclei (in blue). Shown are photos taken at 20X. Scale bar, 100 μ m.

A



B

Groups		hiPSC Clones	Teratoma formation	% Efficiency	T cell infiltration	NK cell infiltration
NSG		D1-C1	4/4	100	na	na
		D2-C1	3/3			
Hu-AT (PBMC)	auto	D1-C1	6/8	75	+	+
	allo	D2-C1	0/3	14	++++	+
		D1-C1	1/4			
Hu-AT (NK-depleted PBMC)	allo	D1-C1	1/8	12	++++	na
Hu-AT (Purified NK)	allo	D1-C1	7/8	87	na	+

C

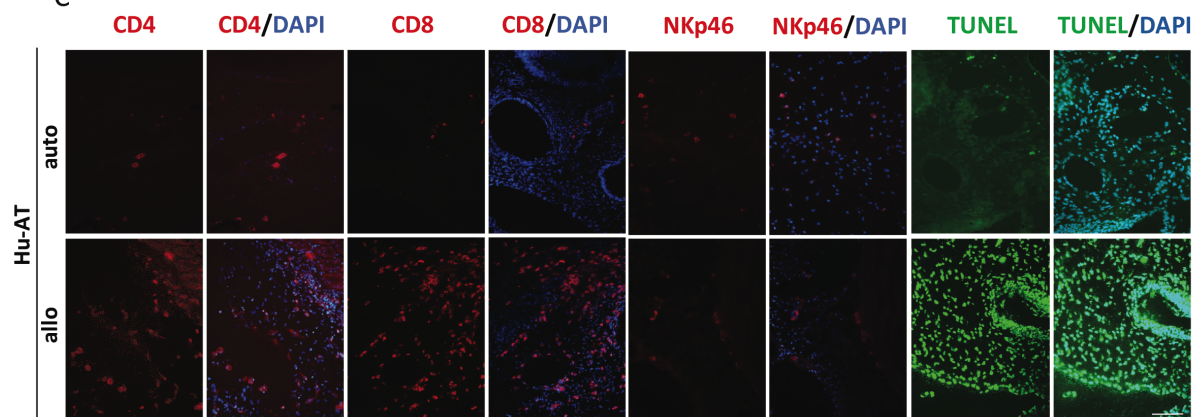
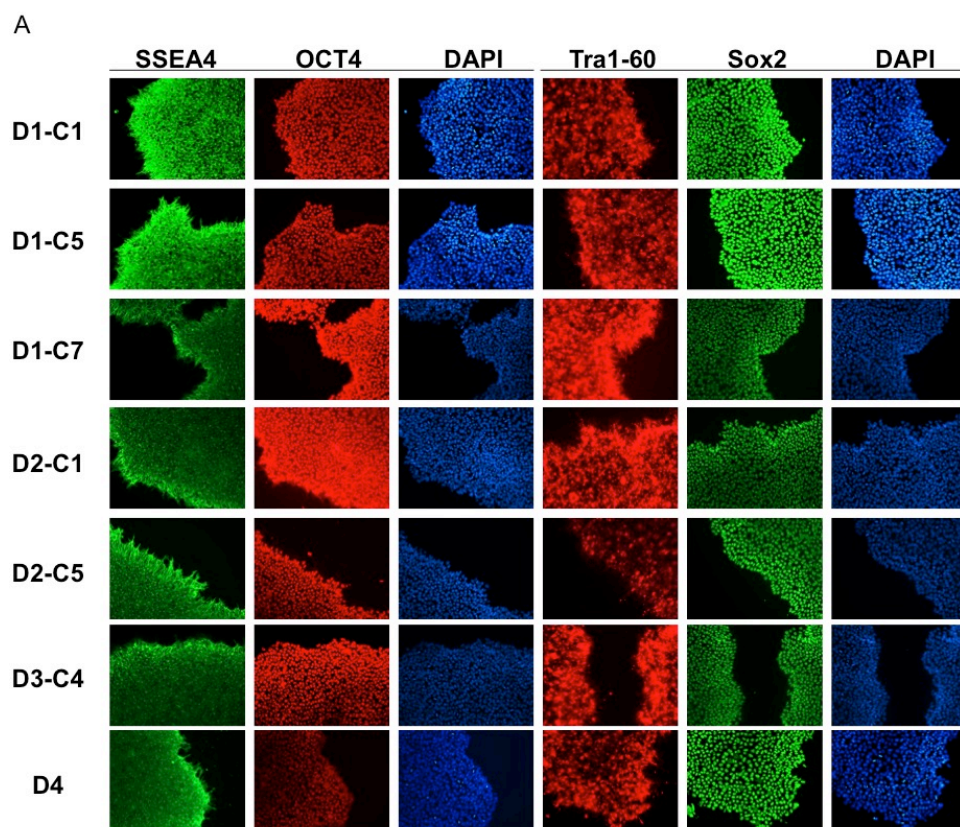


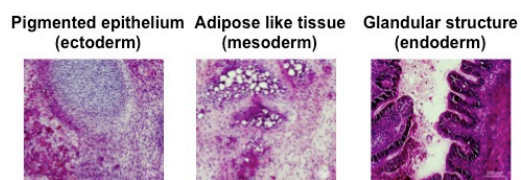
Figure 4. Established teratomas are not the target of NK cells in Hu-AT mice.

(A) Experimental design and timeline of the injection of hiPSCs in Hu-AT mice. Approximately 1×10^6 hiPSCs were first injected under the renal capsule of NSG mice. Six weeks later (W6), mice were injected intravenously with PBMCs, NK-depleted PBMCs or purified NK cells. Two weeks after the adoptive transfer of immune cells (W8), mice were sacrificed and the incidence of teratomas and the infiltration of immune cells determined. **(B)** Incidence of teratoma formation in the renal capsule of Hu-AT mice. Shown is the proportion of teratomas derived from the indicated hiPSC clones and their relative infiltration by T and NK cells. Overall a significant difference was observed between the different conditions ($\chi^2(4)=21.15$, $p < 0.05$). Further analysis reveal a significant difference between Hu-AT (NK-depleted PBMC) allogeneic vs Hu-AT (purified NK) allogeneic ($p < 0.05$). No other significant difference was detected. na = not applicable, + indicates low level of infiltration and ++++ indicates high level of infiltration. **(C)** Representative photos showing the infiltration of $CD4^+$, $CD8^+$ T cells, $NKp46^+$ NK cells (in red) and apoptosis (as determined by TUNEL in green) in sections of teratomas collected from Hu-AT mice injected with allogeneic or autologous 1×10^7 PBMCs. Of note, only one teratoma was retrieved in mice injected with allogeneic PBMCs and used for the staining. DAPI staining was performed to visualize nuclei (in blue). Shown are photos taken at 20X. Scale bar, 100 μm .

VII.2 Supplemental figures and tables



B



C

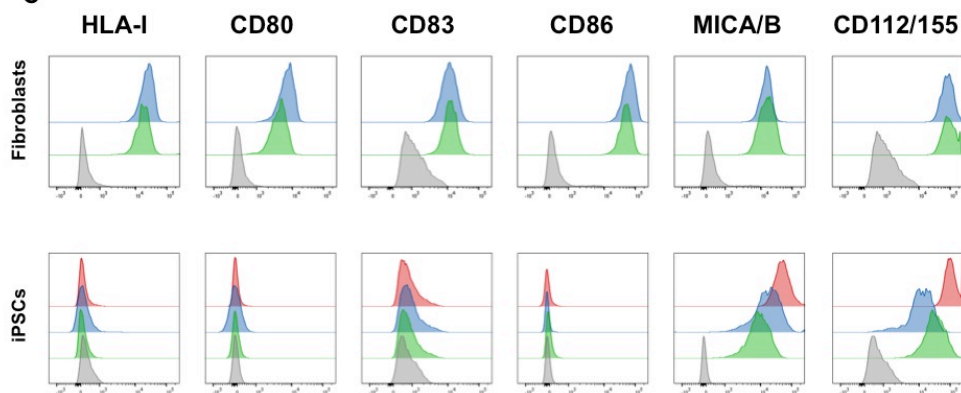
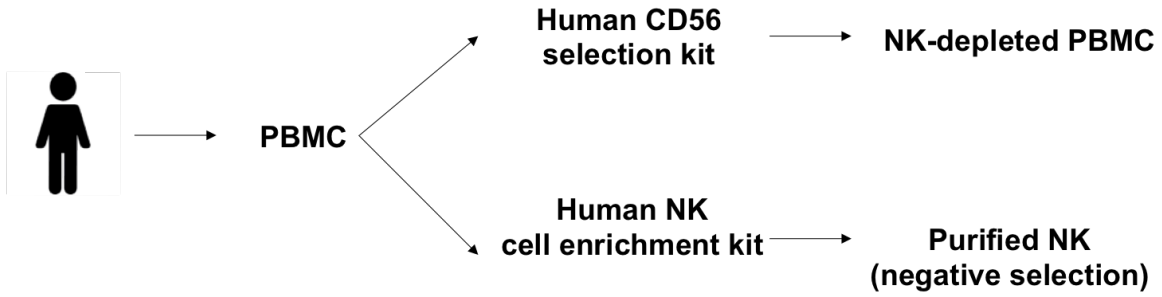


Figure S1. Phenotypic characterization of hiPSCs.

(A) Photos showing the expression of pluripotency marker (Tra1-60, OCT4 in red and Sox2, SSEA4 in green) in skin or PBMC-derived hiPSCs at passage 15 used in this study. Cells were cultured in feeder-free conditions on Geltrex-coated dishes in E8 Flex medium and passaged every 3-4 days. **(B)** Hematoxylin and eosin staining of a teratoma derived from C1 of iPSC.1 at passage 17 injected under the renal capsule of a NSG mouse and grown during 8 weeks. Representative photo showing tissues from the three embryonic germ layers is shown. **(C)** Phenotypic characterization of human skin fibroblasts and hiPSCs derived either from fibroblasts (D1-C1, D2-C5, D4) or PBMCs (D3-C4). Cells were stained with the indicated mAbs or IgG isotype controls and analyzed by flow cytometry. Top panel: representative characterization of skin fibroblasts (in blue) or fetal liver fibroblasts (in green) is shown. Lower panel: representative characterization of hiPSCs-derived from skin fibroblasts (in blue), from fetal liver fibroblasts (in green) and from PBMCs (in red) is shown. Isotypes are shown in grey.

A



B

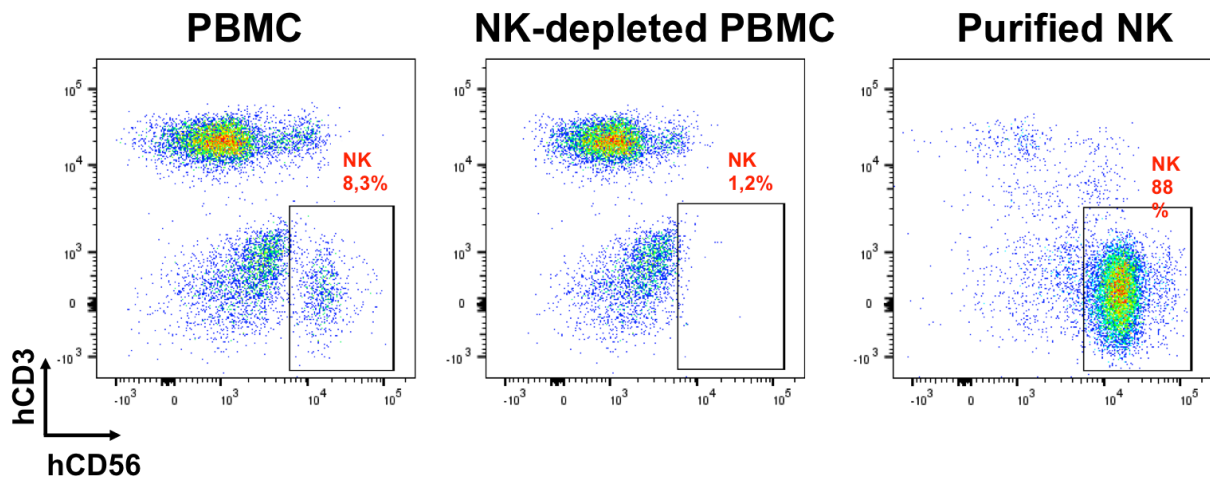


Figure S2. Purification strategies for the adoptive transfer of human immune cells.

(A) Schematic illustration of the isolation protocols applied for the magnetic depletion or purification of NK cells from PBMCs used for the reconstitution of the Hu-AT mice. (B) Representative cell acquisition by flow cytometry of the PBMCs, NK-depleted PBMCs and purified NK showing the proportion of NK cells in the each cell population.

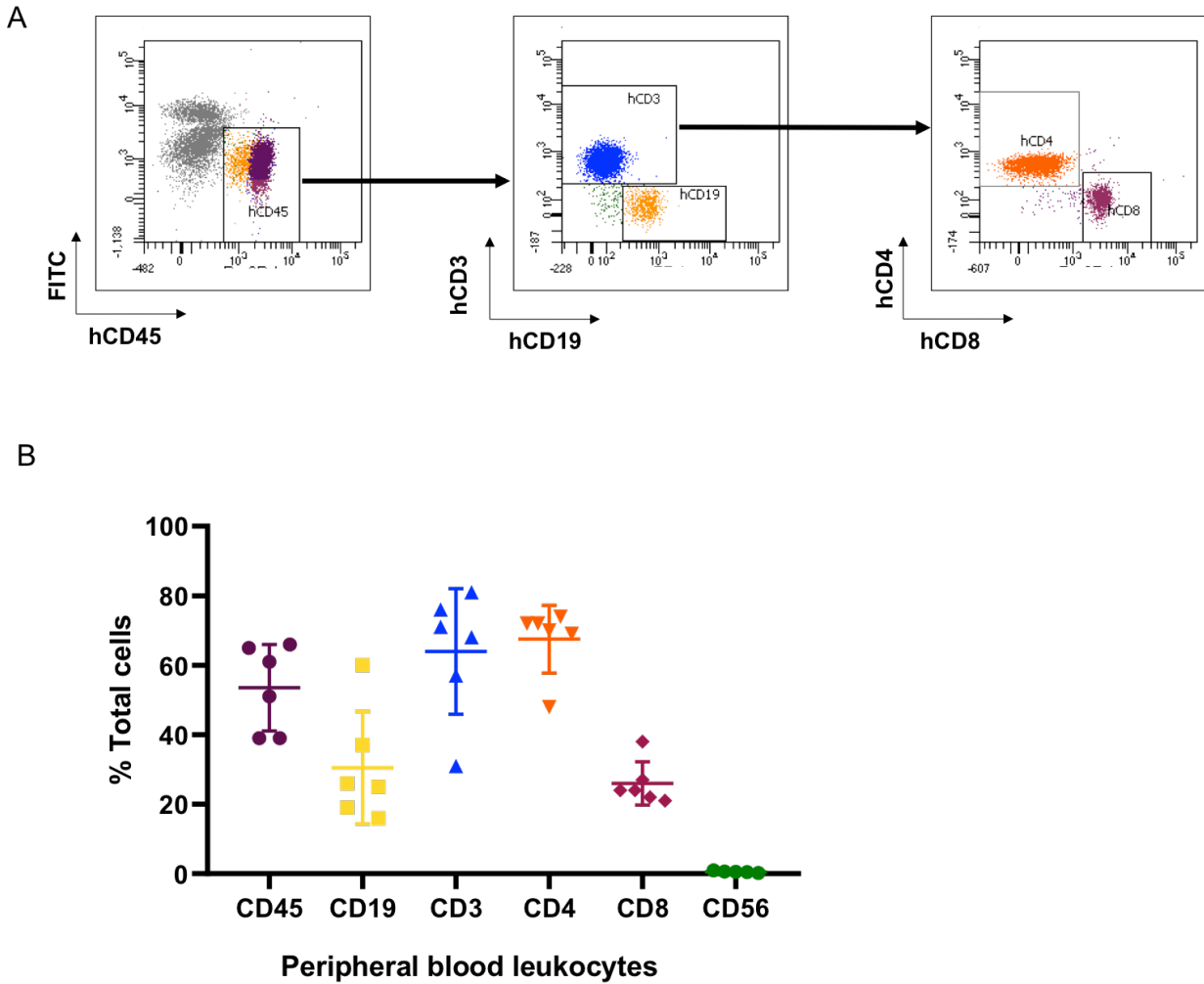


Figure S3. Peripheral blood immune reconstitution in Hu-BLT mice.

(A) Immune reconstitution of a Hu-BLT mouse 13 weeks following the intravenous injection of fetal liver CD34⁺ cells and transplantation of autologous thymic tissues under the renal capsule. Representative plots showing human T cells (CD3, CD4) and B cells (CD19) reconstitution in peripheral blood are shown. **(B)** Percentages of the major leucocytes subsets found in the peripheral blood of representative Hu-BLT mice 12 weeks following their reconstitution. First, hCD45 expressing cells were gated to estimate the total level of engrafted human cells then the percentage of T cells (hCD3⁺), and B cells (hCD19⁺) were determined among hCD45⁺ cells. hCD4⁺ cells and hCD8⁺ cells among hCD3⁺ cells and hCD56⁺ among hCD3⁻ cells.

A

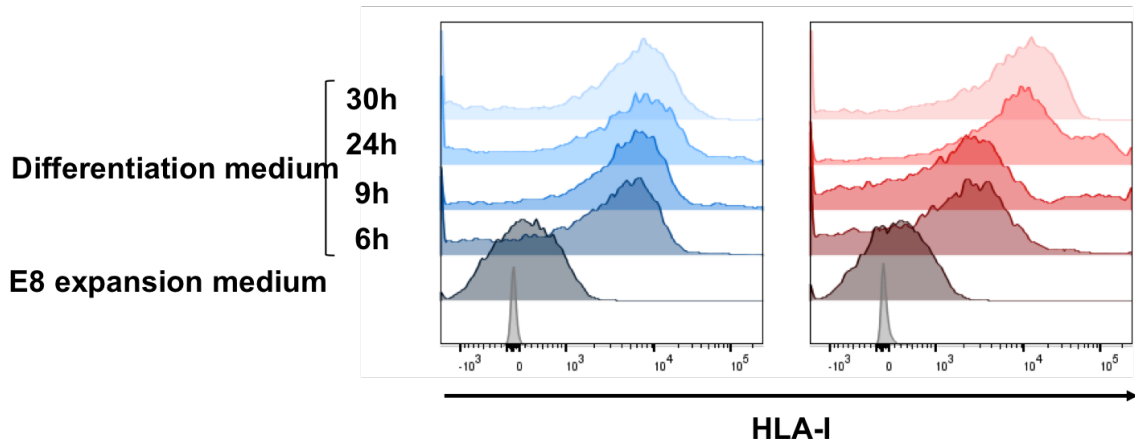


Figure S4. HLA-I acquisition of hiPSCs in differentiation medium.

(A) Histograms showing the rapid expression of HLA-I molecules in cells following the addition of 10% fetal bovine serum compared to control cells maintained in E8 Flex expansion medium as determined by flow cytometry. Cells were stained at different time points with the anti-HLA-I mAb or IgG isotype control. Results from skin fibroblasts-derived hiPSCs (D1-C1) in blue and PBMC-derived hiPSCs (D3-C4) in red are shown. Isotypes are shown in grey.

Table 1: List of used antibodies

Antibodies	Clones	Catalog #	Suppliers
PerCP-Cy5.5-hCD45	HI30	304014	Biolegend
APC-hCD3	UCHT1	300412	Biolegend
PE-hCD19	HIB19	302208	Biolegend
FITC-hCD4	A161A1	357406	Biolegend
PE-hCD69	FN50	310906	Biolegend
Purified anti-human CD3	OKT3	317301	Biolegend
7-AAD	6274739	51.68981E	BD Biosciences
FITC-hCD107a	5123804	555800	BD Biosciences
FITC-hCD107b	4341653	555804	BD Biosciences
Purified anti-human CD4	RPA-T4	300502	Biolegend
Purified anti-human CD8	HIT8a	300901	Biolegend
Purified anti-human NKp46/NCR1	195314	AF1850	R&D systems
BV-711-hHLA-ABC	G46-2.6	565333	BD Biosciences
PE-Cy7-hCD80	2D10	205207	Biolegend
PE-hCD83	HB15e	305307	Biolegend
APC-hCD86	B70	305411	Biolegend
APC-hMICA/B	6D4	320907	Biolegend
PE-hCD155	SKIL4	337609	Biolegend
PE-hCD112	TX31	337409	Biolegend

Table 2: List of all hiPSC clones used and their sources

Donors	iPSC lines	iPSC clones	Sources
1	D1	C1	Skin fibroblasts
		C5	
		C7	
2	D2	C1	Skin fibroblasts
		C5	
3	D3	C4	PBMCs
23-16	D4	-	Fetal liver fibroblasts

VIII. References

- [1] H. Hentze, P.L. Soong, S.T. Wang, B.W. Phillips, T.C. Putti, and N.R. Dunn, Teratoma formation by human embryonic stem cells: evaluation of essential parameters for future safety studies. *Stem Cell Res* 2 (2009) 198-210.
- [2] M.O. Lee, S.H. Moon, H.C. Jeong, J.Y. Yi, T.H. Lee, S.H. Shim, Y.H. Rhee, S.H. Lee, S.J. Oh, M.Y. Lee, M.J. Han, Y.S. Cho, H.M. Chung, K.S. Kim, and H.J. Cha, Inhibition of pluripotent stem cell-derived teratoma formation by small molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (2013) E3281-90.
- [3] A. Bedel, F. Beliveau, I. Lamrissi-Garcia, B. Rousseau, I. Moranvillier, B. Rucheton, V. Guyonnet-Duperat, B. Cardinaud, H. de Verneuil, F. Moreau-Gaudry, and S. Dabernat, Preventing Pluripotent Cell Teratoma in Regenerative Medicine Applied to Hematology Disorders. *Stem Cells Transl Med* 6 (2017) 382-393.
- [4] T. Zhao, Z.N. Zhang, Z. Rong, and Y. Xu, Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature* 474 (2011) 212-5.
- [5] D. Todorova, J. Kim, S. Hamzeinejad, J. He, and Y. Xu, Brief Report: Immune Microenvironment Determines the Immunogenicity of Induced Pluripotent Stem Cell Derivatives. *Stem Cells* 34 (2016) 510-5.
- [6] R. Dressel, J. Nolte, L. Elsner, P. Novota, K. Guan, K. Streckfuss-Bomeke, G. Hasenfuss, R. Jaenisch, and W. Engel, Pluripotent stem cells are highly susceptible targets for syngeneic, allogeneic, and xenogeneic natural killer cells. *FASEB J* 24 (2010) 2164-77.
- [7] C. Groschel, D. Hubscher, J. Nolte, S. Monecke, A. Sasse, L. Elsner, W. Paulus, C. Trenkwalder, B. Polic, A. Mansouri, K. Guan, and R. Dressel, Efficient Killing of Murine Pluripotent Stem Cells by Natural Killer (NK) Cells Requires Activation by Cytokines and Partly Depends on the Activating NK Receptor NKG2D. *Frontiers in immunology* 8 (2017) 870.

- [8] V. Kruse, C. Hamann, S. Monecke, L. Cyganek, L. Elsner, D. Hubscher, L. Walter, K. Streckfuss-Bomeke, K. Guan, and R. Dressel, Human Induced Pluripotent Stem Cells Are Targets for Allogeneic and Autologous Natural Killer (NK) Cells and Killing Is Partly Mediated by the Activating NK Receptor DNAM-1. *PLoS One* 10 (2015) e0125544.
- [9] H.C. Tseng, A. Arasteh, A. Paranjpe, A. Teruel, W. Yang, A. Behel, J.A. Alva, G. Walter, C. Head, T.O. Ishikawa, H.R. Herschman, N. Cacalano, A.D. Pyle, N.H. Park, and A. Jewett, Increased lysis of stem cells but not their differentiated cells by natural killer cells; de-differentiation or reprogramming activates NK cells. *PLoS One* 5 (2010) e11590.
- [10] L.D. Shultz, M.A. Brehm, J.V. Garcia-Martinez, and D.L. Greiner, Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. *Nat Rev Immunol* 12 (2012) 786-98.
- [11] J.K. Skelton, A.M. Ortega-Prieto, and M. Dorner, A Hitchhiker's guide to humanized mice: new pathways to studying viral infections. *Immunology* 154 (2018) 50-61.
- [12] T. Zhao, Z.N. Zhang, P.D. Westenskow, D. Todorova, Z. Hu, T. Lin, Z. Rong, J. Kim, J. He, M. Wang, D.O. Clegg, Y.G. Yang, K. Zhang, M. Friedlander, and Y. Xu, Humanized Mice Reveal Differential Immunogenicity of Cells Derived from Autologous Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 17 (2015) 353-9.
- [13] Q. Liang, C. Monetti, M.V. Shutova, E.J. Neely, S. Hacibekiroglu, H. Yang, C. Kim, P. Zhang, C. Li, K. Nagy, M. Mileikovsky, I. Gyongy, H.K. Sung, and A. Nagy, Linking a cell-division gene and a suicide gene to define and improve cell therapy safety. *Nature* 563 (2018) 701-704.
- [14] T. Deuse, X. Hu, A. Gravina, D. Wang, G. Tediashvili, C. De, W.O. Thayer, A. Wahl, J.V. Garcia, H. Reichenspurner, M.M. Davis, L.L. Lanier, and S. Schrepfer, Hypoimmunogenic derivatives of induced pluripotent stem cells evade immune rejection in fully immunocompetent allogeneic recipients. *Nat Biotechnol* 37 (2019) 252-258.

- [15] X. Han, M. Wang, S. Duan, P.J. Franco, J.H. Kenty, P. Hedrick, Y. Xia, A. Allen, L.M.R. Ferreira, J.L. Strominger, D.A. Melton, T.B. Meissner, and C.A. Cowan, Generation of hypoinmunogenic human pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116 (2019) 10441-10446.
- [16] I. Katano, C. Nishime, R. Ito, T. Kamisako, T. Mizusawa, Y. Ka, T. Ogura, H. Suemizu, Y. Kawakami, M. Ito, and T. Takahashi, Long-term maintenance of peripheral blood derived human NK cells in a novel human IL-15- transgenic NOG mouse. *Sci Rep* 7 (2017) 17230.

CHAPITRE 4 - TROISIÈME ARTICLE

I. Mise en contexte

L'objectif de cet article est donc créer un nouveau modèle de souris humanisée capable de développer une population immunitaire humaine représentative incluant des lymphocytes T éduqué dans un contexte MHC humain. À la différence de la souris BLT, le but ici est de remplacer le tissu fœtal par un tissu plus facile d'accès, autant du point éthique que logistique. Pour cela, nous avons donc décidé d'humaniser des souris NSG préalablement irradiées avec des HSC purifiées à partir de sang de cordon accompagnées d'une greffe de morceaux de thymus excisés lors de chirurgie cardiaque pédiatrique dans le muscle quadriceps de la souris. Nous avons suivi la reconstitution immunitaire en périphérie de ces souris CCST et l'avons comparée à celle observée dans des souris BLT et des souris humanisées sans thymus. Nous avons aussi analysé l'histologie de certains tissus ainsi que la reconstitution dans certains organes lors du sacrifice. Nous avons ensuite testé la fonctionnalité des lymphocytes *in vivo* et *ex vivo*. Enfin, nous avons infecté ces souris par le VIH afin de valider l'utilisation de ce nouveau modèle pour l'étude du VIH, puisque c'est une des utilisations majeures de la BLT.

Le détail de tous ces travaux est décrit dans l'article *Generation of Functional Human T-cell Development in NOD/SCID/IL2 γ ^{null} Humanized Mice Without Using Fetal Tissue* par Chloé Colas, , Olga Volodina, Tram N.Q. Pham, Yuanyi Li, William Lemieux, Aurélien Colamartino, Camille Tremblay-Laganière, Frédéric Dallaire, Kathie Béland, Renée Dicaire, Jean V. Guimond, Natasha Patey, Suzanne Vobecky, Nancy Poirier, Éric A. Cohen et Elie Haddad (l'ordre définitif des auteurs n'ayant pas encore été défini à ce stade), qui est en cours de préparation pour être soumis dans la revue *JCI insight*.

C. Colas, E. Haddad et E. Cohen ont élaboré les plans expérimentaux. C. Colas et Y. Li ont construit le modèle et ont produit toutes les souris humanisées utilisées dans ces expériences, ont suivi leur reconstitution et ont testé la fonctionnalité des cellules T *in vivo* et *ex vivo* avec l'aide ponctuelle de W. Lemieux, A. Colamartino et C. Tremblay-Laganière. O.

Volodina, T. Pham et F. Dallaire ont infecté les souris avec le VIH et ont réalisé toutes les expériences de test et de suivi après l'infection. R. Dicaire, J. Guimond, S. Vobecky, N. Poirier et N. Patey ont participé à l'obtention du tissu fœtal et du thymus de chirurgie cardiaque. C. Colas, K. Beland et E. Haddad ont rédigé l'article, ainsi que Dr Cohen et les membres de son laboratoire.

Generation of Functional Human T-cell Development in NOD/SCID/IL2 γ ^{null} Humanized Mice Without Using Fetal Tissue

Chloé Colas^{1,2}, Olga Volodina³, Yuanyi Li², Tram N.Q. Pham³, William Lemieux^{1,2}, Aurélien Colamartino^{1,2}, Camille Tremblay-Laganière^{1,2}, Frédéric Dallaire³, Renée Dicaire², Jean Guimond⁴, Natasha Patey^{2,5}, Suzanne Vobecky⁶, Nancy Poirier⁶, Kathie Béland², Éric A. Cohen^{1,3&} and Elie Haddad^{1,2,7,&*}

¹Department of Microbiology and Immunology, University of Montreal, Montreal, Canada; ²CHU Sainte-Justine Research Center, Montreal, Canada; ³Montréal Clinical Research Institute, Montréal, Canada; ⁴CSSS Jeanne Mance Center, Montreal, Canada; ⁵CHU Sainte-Justine, Department of Pathology, University of Montreal, Canada; ⁶CHU Sainte-Justine, Department of cardiac surgery, Montreal, Canada; ⁷University of Montreal, Department of Paediatrics, Montreal, Canada.

& Co-corresponding authors

***Correspondence:** Elie Haddad, Research Centre, Saint-Justine Hospital, 3175 Chemin de la Côte Sainte-Catherine, Montréal, Canada, H3T 1C5. Email: elie.haddad@umontreal.ca ; or

Éric A. Cohen, Laboratory of Human Retrovirology, Montréal Clinical Research Institute. 110 Pine Ave West, Montréal, Canada H2W 1R7. Email: eric.cohen@ircm.qc.ca

One Sentence Summary: We herein report a new humanized mice model that develops a functional T cell compartment without the use of fetal tissues.

II. Abstract

Currently, generating humanized mice with fully functional T cells relies on the co-implantation of hematopoietic stem cells from fetal liver together with autologous fetal thymic tissue (BLT mouse). However, access to human fetal tissues is challenging both from the ethical point of view and logistic. The goal of our study was to find an alternative to the use of fetal tissues to create a humanized mouse model with functional T cells. We used pediatric thymus excised during cardiac surgeries (CS thymus), combined with the injection of CD34⁺ cells isolated from umbilical cord blood (CCST mice). *In vitro*-cultured CS thymus pieces were implanted in quadriceps of NOD/SCID/IL2 γ ^{null} mouse. CCST mice exhibited a significantly greater engraftment of T cells, both in time and magnitude, compared to humanized mice without thymus. T cells from both CCST and BLT mice showed comparable function as evaluated by proliferation assays upon PHA stimulation *ex vivo* and rejection of allogeneic leukemic cell lines *in vivo*. CCST mice were susceptible to HIV-1 infection via mucosal or intraperitoneal route, as shown by detectable viral load, HIV DNA and p24⁺ cells, at levels equivalent to those of BLT mice. Importantly, *ex vivo* HIV-1-specific T-cell responses observed in CCST mice were significantly higher than in BLT mice ($p < 0.0001$ for CD8⁺ cells, $p < 0.01$ for CD4⁺ cells). HIV-infected CCST responded to antiretroviral therapy and developed a reservoir. In conclusion, CCST mice represent an interesting alternative to the regular BLT mouse model and these easy-to-access tissues could be used to generate a larger number of mice.

Abstract word count: 250 words

III. Introduction

For the last three decades, the development of humanized mouse aiming at modeling more faithfully the human immune system has been a quest. Indeed, several human diseases cannot be modeled in rodents, thus hindering research in immunopathophysiology and drug development. To obtain a humanized immune system, the most commonly used model is achieved by injecting human hematopoietic stem cells (HSC) in sublethally irradiated NOD/SCID/IL2 γ^{null} (humNSG) mouse. This model allows for the development of lymphoid and myeloid human cells but only with partial function.(1, 2) Indeed, in the absence of human thymic environment, T cells progenitors stemming from the bone marrow cannot undergo full maturation and education as the mouse thymus does not express human major histocompatibility complexes (MHC) molecules. To address this problem, fetal human thymus piece can be engrafted under the kidney capsula of the mouse, along with HSC purified from autologous fetal liver. This model, called Bone-marrow-Liver-Thymus (BLT) humanized mouse model, results in improved T cell reconstitution and function compared to the humNSG.(1, 3, 4) Humanized model displaying a functional T cell compartment, such as the BLT, is paramount in the studies of several T-cell mediated diseases, such as human immunodeficient virus (HIV) infection.

The development of humanized mice has been a revolution for the field of HIV. Indeed, *in vitro* experiments using viral particles, transformed cells lines and primary cells have brought many important insights but were limited as they did not reproduce the key features of an organism. It is not possible to infect mice with HIV since mouse cells do not provide essential cofactors for HIV-1 replication(5). Humanized mouse models have thus been used as an alternative strategy to study HIV-1 infection as they were shown to support HIV replication and recapitulate the major aspects of HIV infection and pathogenesis in humans. When inoculated with HIV-1, humNSG mice develop high levels of plasma viraemia and HIV-specific antibodies, with HIV-infected cells invading multiple tissues(6-8). However, in the humNSG model, the human immune response is very weak because of an impaired T cell-B cell interaction due to the fact that human T cells develop in the mouse thymus and display a restriction driven by murine MHC and not by human HLA (reviewed in (1)). Moreover, humNSG mice do not support the mucosal infection route. The BLT model is now accepted as the best humanized mouse model to study HIV pathogenesis and treatment (9, 10). Intraperitoneal inoculation of BLT mice with HIV-1 results in high levels of sustained viraemia,

CD4⁺ T cell depletion and virus-specific humoral and cellular immune responses.(11) Given that BLT mice are fully reconstituted with multiple human hematopoietic lineages throughout the body, including critical mucosal surfaces such as the intestine and female reproductive tract, another advantage of this model is the ability to infect animals with HIV-1 by mucosal routes of inoculation.(12, 13) Thus, BLT mice provide a useful model to study antiretroviral treatments and have been used to demonstrate that antiretroviral drugs, whether delivered intra-veinous or topically, can prevent HIV-1 infection.(12, 14, 15)

Altogether, the BLT mouse model is the most suitable model to study human immune system functions to date, and is the gold-standard for HIV studies. However, access to human fetal tissues is challenging and even inaccessible in several countries, and thus this model is not broadly available for research labs worldwide. Moreover, fetal tissues are not large in size, thus limiting the number of mice that can be made with the one donor. This limitation increases the variability of pre-clinical studies and would benefit from having access to greater amount of thymic tissues. Thus, the goal of our study was to develop a new humanized mouse model using easy-to-access pediatric thymus obtained from cardiac surgeries to support an optimal T cell reconstitution (Cord blood Cardiac Surgery Thymus (CCST) mouse model). Herein, we report a new humanized mice model that develops a functional T cell compartment and recapitulates the key features of HIV-1 infection, without the use of fetal tissues.

IV. Results

Structure of Primary and Secondary Lymphoid Organs Recovered from BLT and CCST Mice

The CCST model is based on the engraftment of pediatric thymic tissues, discarded in the context of a cardiac surgery, into the quadriceps muscle of the mouse (Fig. 1A-B), similar to what is being done in human thymus graft. (16, 17) We assessed the need to culture the piece *in vitro* prior to engraftment in order to eliminate mature T cells from the thymic pieces. Mice engrafted with uncultured thymus pieces developed a graft-versus-host-disease (GvHD)-like syndrome and died in less than two months (Supp. Fig 1A). When the thymic pieces were cultured *in vitro* from 7 to 15 days before being engrafted (Fig. 1B), as performed in human thymus graft (16, 17), survival of the mice was significantly increased and mice survived for more than 20 weeks post-humanization (Supp. Fig. 1A). In order to see if it was possible to humanize the CCST model with biobanked tissues, we compared mice made with fresh thymic tissues or were previously frozen thymus pieces. Mice humanized with biobanked tissues performed equally well as mice made with fresh thymus pieces in respect to immune reconstitution and T cell function (Supp. Fig 1 B-C).

Fetal thymuses engrafted under the kidney capsule of BLT mice were capable of growing to a size that reached more than 10 times the initial size of the implanted piece. In contrast, CS thymus from CCST didn't grow and were hard to recover and separate from muscle fiber. Nevertheless, histological analysis showed in both cases that thymuses were well integrated in the surrounding tissues with the presence of a connective tissue (Fig. 1C). Moreover, in both models, thymuses were similarly populated with numerous CD3⁺ and some CD19⁺ cells. Hassall's corpuscles structures were observed (Fig. 1C-Left panel). In the CSST mice, bigger Hassall's corpuscles were found, testifying the increased activity of the thymus. Sizes of Hassall's corpuscles were concurrent with the occurrence of GvHD and the reach of the limit points related to the severity of the disease (data not shown). Unlike humanized mice without human thymus graft, both BLT mice and CCST mice allowed the development of mesenteric lymph node (MLN) with similar typical structure, including germinal center with distinct lymphocytes T and B zones (Fig. 1C-Right panel). Spleens from both models also displayed comparable structures (Fig. 1C-Middle panel). Hence, CCST mice developed primary and secondary lymphoid organs that are comparable to the BLT model.

Human Immune Cells Reconstitution in CCST Mice

The human immune reconstitution kinetics in peripheral blood of the mice was then assessed. In BLT and CCST models, human hematopoietic cell engraftment could be observed as early as two weeks after humanization (Fig. 2A). BLT mice showed a slower reconstitution than CCST mice, but reached higher levels of hCD45⁺ than mice reconstituted with hCD34⁺ cells harvested from cord blood with or without thymus (CCST and humNSG respectively). Indeed, BLT showed a reconstitution going from 60% to 73% of hCD45⁺ cells among all CD45⁺ cells (murine and human combined) between week 10 and 20 post-graft while CCST and humNSG both plateaued at 60% of hCD45⁺ at week 5 post graft (Fig. 2A-upper line). We observed a similar kinetic of reconstitution for the hCD19⁺ and hCD14⁺ in all the three model of mice, albeit to different levels (Fig. 2A-bottom graphs). The main difference in reconstitution was noticed for hCD3⁺ (calculated among hCD45⁺-Fig. 2A). While only less than 1% of hCD3⁺ cells were found at 10 weeks post-humanization in humanized mice without thymus (humNSG-Fig. 2A), BLT mice supported the development of those cells within 2 to 3 weeks post humanization which resulted in a rapid and robust reconstitution of hCD3⁺ population (Fig. 2A). CCST mice also displayed early T cells reconstitution, with the detection of hCD3⁺ cells after 2 weeks post-humanization, that then increased gradually throughout the life of the mice (Fig. 2A).

The relative proportion of the different human immune population in the blood was compared between BLT and CCST mice. In BLT mice, the hCD3⁺ population increased in proportion through time and stabilized with a human immune compartment composed of mainly T cells (hCD3⁺), with a minority of B cells (hCD19⁺) and monocytes (hCD14⁺) (Fig. 2B). In contrast, CCST exhibited a predominance of B cells (hCD19⁺), balanced with hCD3⁺ and hCD14⁺ as well as with others hCD45⁺ cells (Fig. 2B). Interestingly, this cell distribution remained stable through time. Within the hCD3⁺ population, the proportions of hCD4⁺ and hCD8⁺ cells were comparable between BLT and CCST mice, although CCST data showed a higher variability between mice (Fig. 2C). Analysis of the human immune population in the lung, liver, bone marrow and spleen at sacrifice showed that hCD45 were comparable between BLT and CCST mice, while hCD3 were significantly higher proportion in tissues of BLT mice compared to

CCST (Fig 2D). Human CD4 and hCD8 proportions were also significantly higher in tissues of BLT mice compared to CCST mice (Fig. 2E).

Functionality of T cells from CCST and BLT mice are Comparable

Since T cell function in humanized models is the keen feature to achieve, we have tested this function through a tumor challenge and a PHA-dependant proliferation assay. The tumor challenge was performed by injecting allogeneic luciferase-expressing pre-B leukemic cell lines REH. All REH-challenged humNSG reached high level of luciferin 3 to 6 weeks following the tumor cell injection and died within 6 weeks (Fig. 3A-B), while no REH leukemic cells were detected in any BLT mice, as shown by the absence of luciferin signal and 100% survival rate (Fig. 3A-B). In comparison, CCST mice response to REH challenge was more variable. Indeed, around 50% of the CCST mice behaved as BLT and controlled leukemic cell growth. The other half of the mice allow the establishment of leukemia, but with a significant delay in the kinetic of leukemic dissemination compared to humNSG, and consequently in survival ($p < 0.001$, Fig. 3A-B).

The proliferating capacity of T cells from those 3 models was tested. The capacity of T cells to proliferate in response to polyhydroxyalcanoate (PHA) was assessed in all mouse model. First, we observed a clear change in size and forward scatter parameters in the lymphocyte gate cells for BLT and CCST mice compared to humNSG (Fig. 3C). Moreover, hCD4⁺ and hCD8⁺ cells isolated from CCST and BLT mice both incorporated EDU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) in response to PHA stimulation (no significative difference between the two groups). In contrast, cells isolated from humNSG did not respond to PHA stimulation, either in respect to size change or EDU incorporation (Fig. 3D, $p < 0.01$). T cells isolated from BLT and CCST mice had respectively 4 and 2 folds more cells that had incorporated EDU than humNSG (Fig 3D, $p < 0.01$). Altogether, these data suggest that T cells activity in our model is close to what is observed in BLT mice, and thus leads to a better T cells function than humanized mice without human thymus.

HIV infection in CCST Mice is More Robust than in BLT mice

As stated above, BLT mice are the gold-standard of humanized mouse model to study HIV pathogenesis and treatment (9, 10). We thus compared the key characteristics of HIV infection in CCST compared to BLT model using NL4.3-ADA-GFP HIV-1 particles (Fig. 4A). First, we observed that both mouse model were susceptible to HIV-1 infection via mucosal or intraperitoneal route, as viral loads were detectable at similar levels through time post-infection (Fig. 4B). Similarly, real-time PCR analysis showed comparable levels of total and integrated HIV DNA were found in spleen, lung and liver in both models, suggesting that HIV can spread equivalently in both models (Fig. 4C). Finally, flow cytometry analyses found that p24⁺hCD3⁺hCD8⁻ were in similar proportion in spleen, lung, liver and bone marrow of mice (Fig. 4D; gating strategy illustrated in Supp. Fig. 2).

Immune response towards HIV-1 was then assessed by analysing the *ex vivo* response to antigen-specific stimulation of isolated T cells from CCST and BLT mice. Interestingly, a significantly higher proportion of hCD3⁺hCD8⁺ and hCD3⁺hCD4⁺ T cells isolated from CCST mice were positive for human interferon gamma (hIFN γ) in response to pooled Clade B HIV-1 peptides, compared to BLT mice (Fig. 5A-B; $p < 0.0001$ for CD8⁺ cells, $p < 0.01$ for CD4⁺ cells). This production of hIFN γ was specific to HIV-1 peptides as exposition to irrelevant peptides (LCMV pool) did not induce hIFN γ production. Correspondingly, HLA-DR and CD69 activation markers were expressed in a significantly higher proportion of CD8 and CD4 T cells isolated from the blood of uninfected CCST mice when compared to BLT (Fig. 5C; $p < 0.0001$ for CD8⁺ and CD4⁺ cells). After HIV infection, HLA-DR and CD69 in CD4⁺ and CD8⁺ were significantly higher in spleen of CCST and BLT mice, while CD38 in CD8⁺ was also increased in CCST mice. (Fig. 5D) HIV-1 infected CCST mice add significantly higher HLA-DR⁺CD4⁺, CD69⁺CD4⁺ and PD-1⁺CD4⁺ than infected BLT mice (Fig. 5D).

Antiretroviral treatment in CCST and BLT mice

Another important feature of HIV research in humanized models is the response to antiretroviral treatment (ART) and the modelization of latency. To study this aspect, we have treated HIV-1-infected CCST and BLT mice with a three to six-week regiment of emtricitabine, tenofovir and raltegravir (Fig. 6A). Plasmatic viral loads were found to be significantly reduced in mice undergoing ART compared to untreated mice, both in CCST and BLT (Fig. 6B). Antiretroviral

treatment interruption resulted in a rebound in rapid HIV viral load in plasma of CCST mice, indicating that CCST mice supports a HIV reservoir and can be use as a latency model. Congruent with this observation, total and integrated HIV DNA remained unchanged in the ART-treated CCST in all tested tissues (Fig. 6D), but were found to be significantly reduced in the spleen of BLT mice treated with ART ($p<0.001$ for total DNA, $p<0.0001$ for integrated DNA). When looking at HIV RNA in different organs (spleen, bone marrow, lung, liver and brain), ART resulted in slight reduction of HIV RNA in all organ except although not significantly, and this was observed both in CCST and BLT models (Fig. 6E). Lastly, the proportion of $p24^{+}hCD3^{+}hCD8^{-}$ cells retrieved from spleen, lung, liver and bone marrow were significantly reduced in ART-treated mice in both models (Fig. 6F, $p<0.001$ in all ART conditions).

V. Discussion

Herein we describe a new model of humanized mice that fosters the development of functional T cells without the use of fetal tissues. This model comes in a timely fashion as political contexts in which research projects conducted with fetal tissues from abortion is becoming increasingly criticized. Indeed, abortion of pregnancies beyond 12 weeks of gestation is forbidden in many countries, and in June 2019 the US Department of Health and Human Services announced that the National Institutes of Health will no longer be able to conduct research using fetal tissues. Therefore, there is a need for the development of new humanized mouse models that will substitute the BLT model without losing its advantages.

Following the same goal as our study, another humanized mouse model not requiring fetal tissues was recently developed: the NeoThy humanized model.(18) In this model, neonatal thymus pieces are implanted in the kidney capsula along with i.v. injection of CD34⁺ isolated from cord blood. Similar to our results, this model leads to the development of functional T cells. (18) The NeoThy model is different from the one described herein in two major ways: the NeoThy model uses neonatal thymus of approximately 10 days old, compared to the use of pediatric thymus in the CCST model (range between birth and 5 years old), and they implant the thymus pieces in the kidney capsula compared to the implantation in the quadriceps. As they did, we first tried to implant our pediatric thymus pieces in the kidney capsula to mimic the BLT model (data not shown). However, pediatric thymus pieces did not implant in that site, which led us to modify our approach and perform a surgery that is closer to a thymic graft in human.(16, 17) We posit that engrafting the thymus pieces into the quadriceps instead of kidney capsula is a technical approach that is more robust and thus allows for the use of a wide range of pediatric thymus, enlarging the availability of material. Indeed, we did not see differences in the quality of reconstitution or function according to thymus age (data not shown). Another advantage of this technique is the fact that we can freeze the thymic pieces and the CD34⁺ cells to perform the humanized mice when needed (Fig Supp. 1). Interestingly, as described in thymus graft (19), and as observed for the NeoThy model (18), HLA-compatibility did not have an impact on reconstitution or function of the immune system (data not shown). However, the use of pediatric thymus seems to require a pre-incubation period in culture in order to prevent rapid occurrence of GvHD. We hypothesized that resident lymphocytes T cells from the thymus

graft are capable to expand and then attack recipient tissues and cells, leading to the death of the mouse. Thus, the culture step is essential to eliminate potentially xenoreactive mature/maturing T cells from the engrafted thymus. By doing so, the T cells developing in the CCST mice are all stemming from the injected HSC that are niched in the bone marrow of the humanized mice, which may explain the observed delay in the hCD3⁺ reconstitution kinetic of CCST compared to the BLT, in which fetal tissue is engrafted without being cultured beforehand.

The CCST humanized mice displayed primary and secondary lymphoid organs that are organized, suggesting that functional system is developing in these mice. In both BLT and CCST models, the implanted thymus displayed medullar and cortical arrangement with classic thymic epithelium expressing cytokeratin 19. In the CSST mice, the size of Hassall's corpuscles were concurrent with the occurrence of GvHD suggesting that a very active thymopoiesis in these mice. The spleen of both BLT and CCST models also showed similar structures. Interestingly, megakaryocytes were observed in both models, suggesting splenic extramedullary hematopoiesis. Lastly, mesenteric lymph node with similar typical structure, including germinal centers with distinct lymphocytes T and B zones, were found in BLT and CCST models, a characteristic that distinct them from humNSG in which it is rare to find populated lymph nodes.

Immune reconstitution in the periphery of CCST mice was robust, albeit not as high as BLT, but stronger than humNSG, particularly in respect to the T cell compartment. Interestingly, the progressive replenishment of T cells in the CCST model resembled more to what is observed in human blood after HSC graft. This suggests that peripheral T cells are stemming from the injected HSC and that developed in the mouse, unlike BLT where a portion of T cells are xenoreactive thymic emigrants from the engrafted thymus. Moreover, immune subpopulation proportions' distribution remained stable through time in CCST mice. Similar to other report(3), BLT mice reconstituted a bit slower but finally reached higher levels of humanization in regards to mCD45⁺ population. This difference in reconstitution might be partially due to the sources of hCD34⁺ (fetal liver vs cord blood) and different number of injected cells (5x10⁵ vs 1-2x10⁵ respectively), along with xenogeneic T cell proliferation.

Importantly, the CCST model recapitulates key T cells functions such as PHA-induced proliferation and tumor rejection. This model could be useful in the study of immune interaction with tumors, as one could model patient-derived xenograft (PDX) and implant autologous

immune system from the patient's HSCs. To further study the T cell compartment and function in CCST mice, we focused on the use of the CCST model in the context of HIV research. Indeed, HIV represent the main field utilizing fetal tissues in research(20), hence there is a need for a suitable replacement model for BLT that would be able to reproduce all the important features of HIV infection.

The classic humNSG mouse model is limited for several aspect of HIV infection aspects. Hence, the BLT is prized for its ability to be infected through mucosal route, which is more representative of the main human infection route, its response to ART and the development of latency. Similarly, to the BLT, the CCST model supports HIV infection, both through IP and vaginal mucosal routes, responds to ART, develops a reservoir and latency is observed with ART regiment. Interestingly, CCST mice develops a HIV-specific response that is more vigorous than the BLT, with a stronger proportion of INF- γ producing and activating cells after stimulation with HIV peptides, and this stimulation is specific since irrelevant peptides does not results in cell activation.

Altogether, this new model of humanization is robust and convenient by its wide range of patients that can be donor for the thymus, the abundance of the tissues that allows for the creation of bigger experimental groups, the use of biobanked tissues and the HLA independence. Despite these assets, the CCST model shows more variability than the BLT in terms of reconstitution and of success rate, which are the main limits of this model. Indeed, based on the reconstitution pattern and functionality tests such as REH challenge, we estimate the percentage of success between 59% to 67% CCST groups (based on 28 different groups). There is also a greater variability in the reconstitution in terms of proportion of subpopulations has illustrated in Figure 2. This last aspect can be limiting when studying the role of a subpopulation such as the CD4 infection by HIV. This variability might be linked to the piece of thymus that is implanted in the quadriceps. Indeed, it is technically difficult to identify if the pieces implanted are constituted of medulla and/or cortex. Since this model is based on the use of pediatric thymus, as opposed to fetal, the tissue is more structurally defined and less plastic. Therefore, we posit that variability could be reduced if pieces of medulla and cortex could be co-implanted.

In conclusion, the CCST model is an alternative to the BLT model that could even prove to be better for HIV studies because of its robust antigen-specific T cells response. This model would be interesting to try in other immunodeficient strains such as the MHC knock-out mice in order to study the immune reconstitution in absence of xenogeneic reactions, and in mice transgenic for the expression of human key cytokines. The facility of use of this model, regarding surgery skills and availability of thymic material, could dramatically increase the availability of functional humanized mouse model worldwide and facilitate *in vivo* HIV research.

Supplementary Materials

Movie S1. Movie showing surgery in mouse quadriceps.

Acknowledgments

Authors would like to thanks the CHU Sainte-Justine Cord Blood for Research purpose Biobank.

Funding

This work was supported through the support of the Fondation Charles Bruneau and a “Chaire de Recherche Banque de Montreal” to E.H. and a grant of the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (#HIG-133050) to E.C.. W.L. is supported by a “Fonds de Recherche en Santé du Québec” (FRQS) scholarship award and A.C. by the Cole Foundation scholarship award. C.T-L is supported by a CIHR scholarship award.

Author contributions.

C.C., Y.L., W.L., A.C., C.T-L performed the experiments. O.V., F.D. and T.NQ.P. performed the HIV infections and analysis. R.D. recruited participants and collected samples. J.G, N. Patey, S.V. and N. Poirier provided and processed the human tissues. C.C, O.V., E.C. and K.B. wrote the manuscript. E.H. generated the hypotheses, conceptualized the study and wrote the manuscript.

Competing interests.

The authors declare no potential conflicts of interest.

Data and materials availability.

Not applicable

VI. Materials and Methods

Tissue processing

All research performed on human tissues was conducted with informed consent and under the approval of the Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Sainte-Justine institutional review board (Montreal, Canada) and was performed in accordance with federal and provincial laws. Human autologous fetal thymus and liver were obtained following approval of a research protocol by the CHU Sainte-Justine institutional review board and written informed consent from donors (CER#2126). Fetal tissues were processed the same day as the harvest. Fetal liver was cut in small pieces and shook at 230rpm for 30min at 37°C in a sterile complete RPMI medium (RPMI 1640+GlutaMAX™ (Gibco™ by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) + 10% decompemented fetal bovine serum (FBS) (Gibco™ by Life Technologies™) and Penicillin-Streptomycin (P/S) (Wisent, St-Jean Baptiste, QC, Canada) supplemented with 1mg/ml collagenase (Sigma Aldrich, St-Louis, MO), DNase I recombinant (Roche by Sigma Aldrich) and sodium pyruvate (Sigma Aldrich). The suspension is then filtered with a 70µm cell strainer, and washed with Dulbecco's phosphate buffered saline without calcium or magnesium (dPBS^{-/-}) (Gibco™ by Life Technologies™) with 0.6% citrate phosphate dextrose (Sigma Aldrich). Hepatocytes were then removed by a low speed centrifugation (18G, 5min) and the supernatant was spun again (470G, 5min). Pelleted cells were collected and purified by density centrifugation using FICOLL. HSCs were then enriched by using hCD34 MicroBead kit Ultrapure (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany). hCD34⁺ cells were either resuspended in dPBS^{-/-} and kept on ice until injection in mouse or were frozen in FBS + 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) (Thermo Fisher Scientific).

Human pediatric thymus tissues were obtained from patients undergoing cardiac surgery (n=19, age ranges between 1 days to 5 years old; mean age: 1 year and 2 months, median: 6 months) during their care in CHU Sainte-Justine (Montreal, Canada). Upon reception, thymus was washed in dPBS^{-/-} and cut into small pieces (around 4-8mm³). Pieces were either put in culture or frozen in decompemented human serum type AB (Wisent, Canada) +10% DMSO (10-20 pieces/1ml) as described(4). When put in culture, pieces were placed on the top of a 0.8µm isopore membrane filter (Sigma Aldrich), on top of a 1cm² absorbable gelatin sponge (Pfizer, Kirkland, QC, Canada) in the presence of F12 medium (Gibco™ by Life Technologies™) + 10% FBS + P/S + Fungizone (Gibco™ by Life Technologies™) + HEPES (Sigma Aldrich)

(Fig. 1A) Thymus pieces were kept in culture at 37°C between 7 to 21 days. Fetal thymus were either used directly for surgery in mice or frozen as explained before.

Cord blood CD34⁺ isolation

Human cord blood was obtained from the Cord Blood Research Bank of the CHU Sainte-Justine under the approval of the CHU Sainte-Justine institutional review board and written informed consent from donors. Mononuclear cells were purified by using SepMate™ (Stemcell technologies, Cambridge, MA, USA) using FICOLL (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). As described above, HSCs were then enriched by using hCD34 MicroBead kit Ultrapure. hCD34⁺ cells were either kept in culture at 37°C in RPMI medium with human recombinant Stem Cell Factor (SCF) at 50ng/ml (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA), human recombinant thrombopoietin (TPO) (PeproTech), human recombinant Fms-related tyrosine kinase 3 ligand (FLT3-L) (PeproTech) until injection in mice (within 3 to 6 hours of culture) or were frozen in FBS + 10% DMSO.

Human tissue transplantation

NOD/LtSz-scid IL-2R γ c(null) (NSG) mice were purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). All animal experiments were performed in accordance with protocols approved by each institution's Institutional Animal Care and Use Committee (IRCM 2015-11 and CIBPAR#582&593) following Good Laboratory Practices for Animal Research. All mice were housed in specific pathogen-free animal facility of CHU Sainte-Justine Research Center or in the animal core facility of the Montreal Clinical Research Institute. Six to ten week-old NSG mice were conditioned with sublethal (2.5 Gy) total-body irradiation the day prior the surgery. For BLT mice, human fetal thymus fragments measuring about 1mm³ were implanted underneath the recipient kidney capsule. Within 24 hours, 3-5×10⁵ human autologous fetal liver CD34⁺ cells in 100 µl of dPBS^{-/-} were injected intravenously. For CCST mice, three human pediatric thymus fragments were implanted in the left quadriceps muscle of the mouse and 1-2×10⁵ mixed human cord blood CD34⁺ cells in 100ul of dPBS were injected intravenously. All mice were anesthetized with isofluorane and treated with Buprenorphine for post-operative pain management and their drinking water was supplemented with Baytril antibiotic for 10 days post-surgery.

Engraftment assessment

The presence of circulating human cells was then evaluated weekly in 50µl of peripheral blood harvested through the saphenous vein and collected in heparinized tubes. The absolute number and proportion of cells subpopulation was assessed by FACS using monoclonal antibodies directed against hCD45 (clone HI30), hCD3 (clone UCHT1), hCD19 (clone HIB19), and hCD14 (clone B159) (all from Biolegend, San Diego, CA, USA) and mCD45 (clone 30-F11) (BD Biosciences, Franklin Lake, NJ). Acquisition was done on a FACSCanto or FACS LSRFortessa system (BD Biosciences). Mice were sacrificed when pre-defined limit points were reached. At the time of sacrifice, thymus (if present), liver, mesenchymal lymph node (if present), blood, spleen were harvested and evaluated by histopathology and flow cytometry.

Allogeneic leukemic cell line challenge

Acute lymphocytic leukemia pre-B cells REH (ATTC®, Manassas, VA, USA) expressing luciferase were injected intravenously to mice (5,000 cells in 100µl of dPBS^{-/-}). Mice were then monitored weekly by injecting 3mg D-luciferin (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) intraperitoneally and imaging using an *in vivo* bioluminescence imaging system (LabeoTech, Montreal, QC, Canada) system.

T cells proliferation assay

T cell capacity of proliferating upon stimulation with phytohemagglutinin-L (PHA-L) (Sigma Aldrich) were measured following guidelines of the Click-iT® EdU cell proliferation assays kit (Thermo Fisher Scientific). Briefly, 150-200µl of peripheral blood were harvested through the saphenous vein and collected in heparinized tubes. Red blood cells are then lysed using red blood cell lysis buffer (0.15 M ammonium chloride, 10 mM potassium bicarbonate and 0.1 mM EDTA in distilled water) and put in culture 48 hours with PHA-L (5µg/mL) and then put in contact with EdU (10uM) overnight. The following day, cells were harvested, stained with FITC hCD8a (clone RPA-T8, Biolegend) and hCD4 (clone, RPA-T4, BD Biosciences), and then fixed/permeabilized using Click-iTTM fixative and saponin-based reagent and stained using the fluorescent dye picolylazide to reveal the incorporated EdU. Fixed cells are then analyzed on the FACS Canto or FACS LSRFortessa system.

Histology

The specimens were fixed with buffered-formalin phosphate 10 % and embedded in paraffin. 4 µm sections were prepared, mounted on microscope slides, and stained with hematoxylin phloxin safran. Immunohistochemistry staining was performed on paraffin-embedded slices on the Autostainer Link 48 from Dako with the "ready to use antibodies" hCD3 (polyclonal rabbit), hCD68 (clone KP1), human Cytokeratin 19 (clone AE1/AE3) and hCD19 (EPR5906; Abcam, Cambridge, UK).

HIV Infections

Virus production. 5×10^6 HEK 293T cells were transfected with 20 µg of CCR5-tropic pNL4.3.ADA.GFP proviral DNA (21) by the calcium phosphate method. Culture supernatant was collected at 60 h post-transfection. Virus was concentrated by ultracentrifugation over a 20% sucrose cushion and tittered in HeLa TZMbl and CEM-CCR5 cell lines (NIH AIDS reagent program). TCID₅₀ was calculated using Spearman-Karber method.

Infection. CCST and BLT mice were infected with 200,000 TCID₅₀ of NL4.3-ADA-GFP HIV-1 in 100 µl of DMEM via intraperitoneal injection or vaginal inoculation and monitored for 7 weeks. HIV-1 viral load in plasma of humanized mice was determined weekly using the quantitative COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 test, version 2.0, Roche (detection limit, <20 copies/ml).

ART. Three-week long daily ART, consisting of emtricitabine (100 mg/kg weight), tenofovir (50 mg/kg) and raltegravir (68 mg/kg), was initiated at 5wpi for a group of mice and maintained until the sacrifice. Control group was represented by untreated mice.

Nucleic acid extraction and quantification of HIV genomes by real-time PCR. RNA from spleen cells or other tissues were extracted using RNeasy Mini plus kit (QIAGEN) according to manufacturer's instructions. cDNA was generated using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) and used as templates for HIV RNA analysis or cellular genes as detailed below. DNA from spleen cells, lung and liver cells were extracted from gDNA eliminator columns using Qiamp Fast DNA stool mini kit (QIAGEN) according to manufacturer's instructions. Quantification of total HIV DNA, integrated HIV DNA and unspliced HIV RNA was performed by modified nested real-time PCR assay using Taq DNA polymerase (BioLabs) in the first PCR

and TaqMax Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) in the second PCR (22). DNA from serially diluted ACH2 cells (NIH AIDS Reagent Program, NIAID, NIH), which contain a single copy of the integrated HIV genome, was extracted and amplified in parallel to generate a standard curve from which unknown samples were enumerated. Human CD3 gene was used as a normalizer.

Antigen-specific INF- γ production. Splenocytes from CCST and BLT mice were stimulated with PMA (50 ng/mL) plus ionomycin (500 ng/mL) for 1 hour, or either pooled Clade B HIV-1 peptides (env, gag, pol, nef) (2 μ g/mL) or LCMV peptides (GP61-80, GP276-286) (100 ng/mL) overnight, or kept untreated. Frequencies of IFN γ -expressing human T-cells were then measured by intracellular flow cytometry. Splenocytes from uninfected mice and LCMV stimulation were used to ensure the specificity of the assay.

Flow cytometry. Blood cells and single-cell suspensions from tissues were stained with a combination of fluorescently labeled Abs. Dead cells were excluded using live/dead fixable violet dead cell stain kit (ThermoFisher). Surface-stained cells were fixed and permeabilized using the Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences) as per manufacturer's instructions and intracellularly stained with fluorescently-labeled anti-p24 antibody. Flow cytometry data were collected on a Fortessa flow cytometer (BD Bioscience) and analyzed by Flowjo software (Versions 9.9.3 and 10.1).

Statistics

Data analysis was performed using GraphPad PRISM 8.0 (GraphPad Software). Statistical tests applied for each experiment are stated in legend of figures. A P value of less than 0.05 was considered statistically significant. The following symbols *, **, ***, **** signify <0.05, <0.01, <0.001, <0.0001, respectively. No statistical methods were used to predetermine population size. Randomization was not used.

VII. Figures

VII.1. Main figures

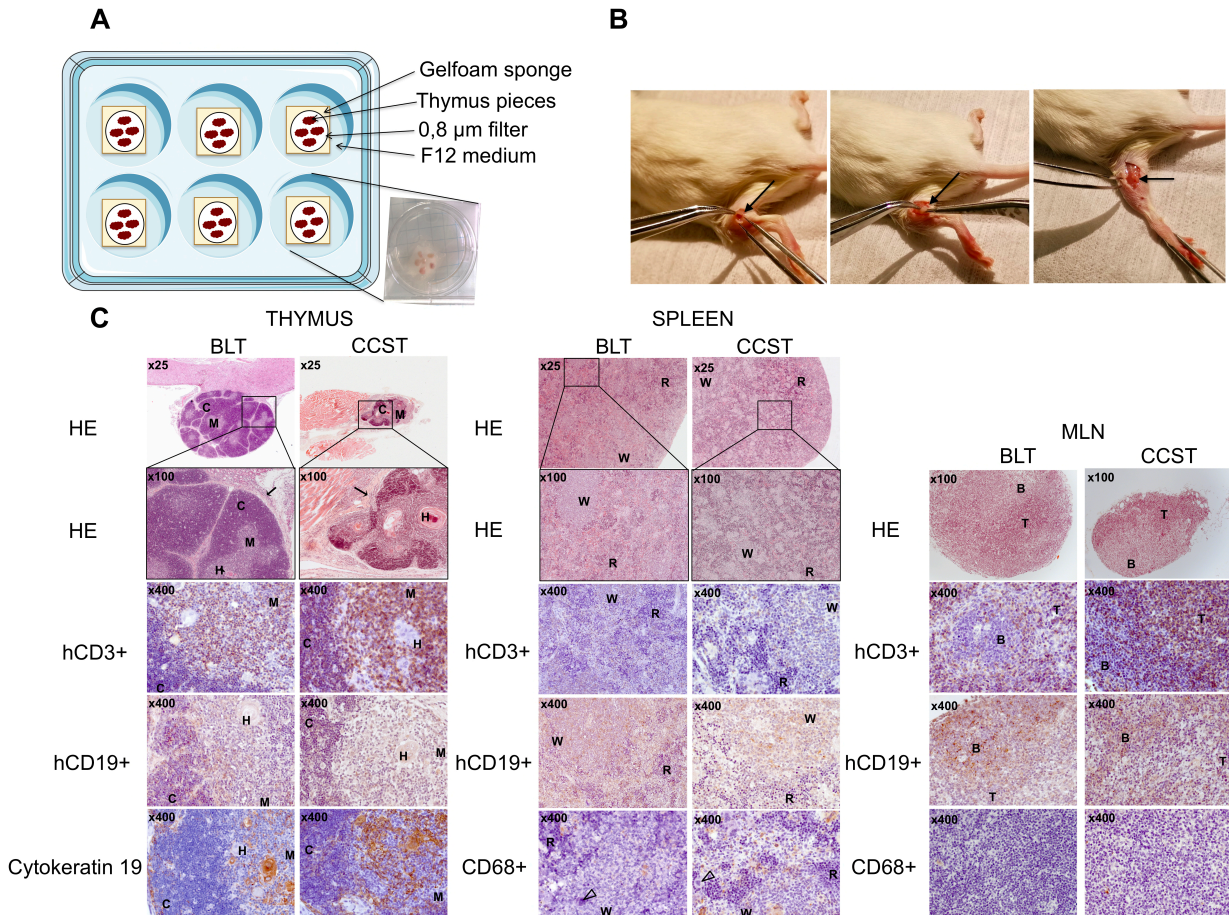


Figure 1. Pediatric thymus from cardiac surgery can be used as an alternative to fetal thymus.

(A) Thymus retrieved from 3-day to 6-year-old donors undergoing cardiac surgery were cut in 1mm² pieces and put on a gelfoam sponge culture system for 7 to 21 days. (B) Then, 2-3 pieces were grafted in quadriceps muscle of NSG mice along with an injection of 1-2x10⁵ umbilical cord blood CD34⁺ (see supporting video in supplemental). (C) Representative thymic tissues sections from both BLT and CCST mice recovered at 30 weeks post-humanization (Left panels). Engrafted tissues were well inserted in the surrounding tissues (black arrow, in the kidney for

BLT; in the quadriceps muscle in CCST). Both models showed typical thymus structure with cortex -C- medulla -M- and Hassal's corpuscles -H-. Spleen tissues from both BLT and CCST (Middle panels) displaying white - W- and red -R- pulp, hCD3⁺, hCD19⁺ and hCD68⁺ cells, as well as megakaryocyte (empty tip). Mesenteric lymph node (MLN) recovered in CCST and BLT mice (Right panels) exhibit germinal center with B and T lymphocytes zone.

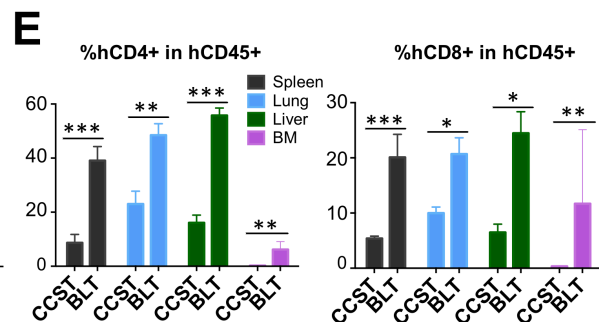
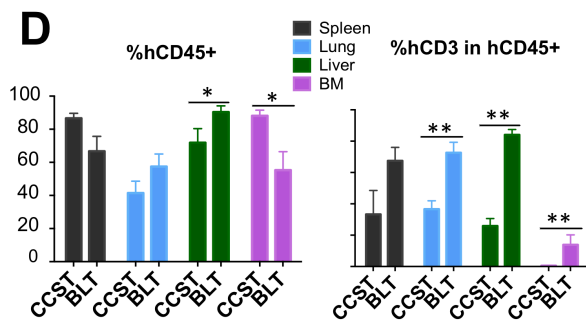
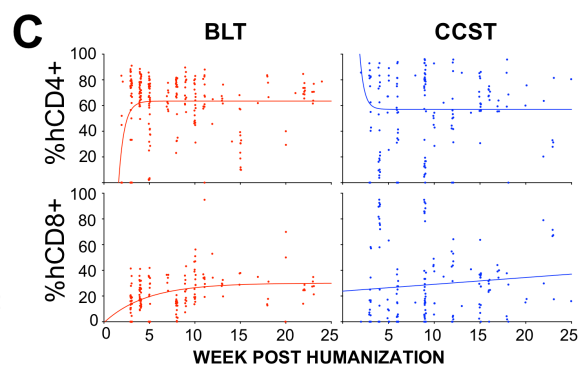
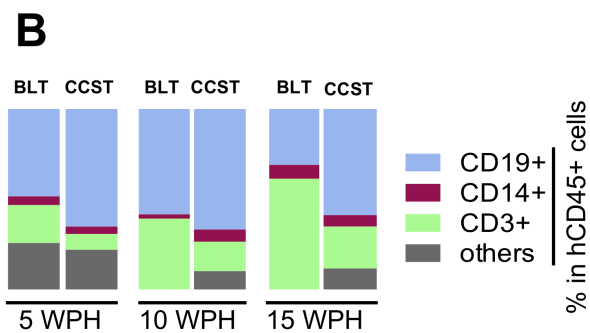
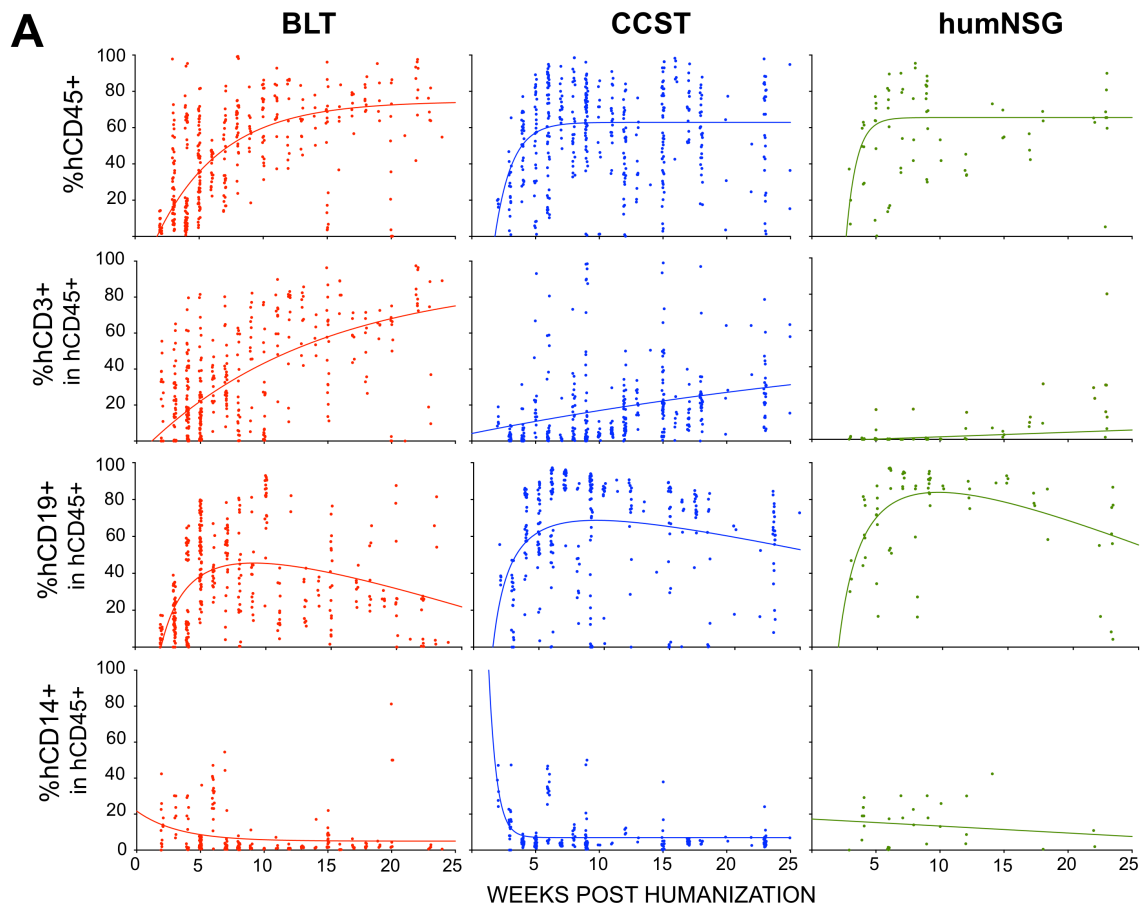


Figure 2. Unlike humanized mice mouse without thymus, CCST and BLT humanized models allowed robust T cells reconstitution.

(A) Peripheral blood from the three humanized mouse models were harvested and analyzed by flow cytometry to monitor the level of human cells reconstitution (one point is one mouse at one time point). Engraftment of hCD45⁺ (calculated among total CD45⁺ cells (mouse and human), hCD3⁺(among hCD45⁺), hCD19⁺ (among hCD45⁺) and hCD14⁺ (among hCD45⁺) are shown. (B) Graphic representation of the relative proportion of human T (CD3⁺), B (CD19⁺) and monocyte (CD14⁺) cells in BLT and CCST mice at 5, 10, and 15 weeks post-humanization showing an increase in T cells proportion through time for BLT mice. (C) Dynamic changes in the level of human CD4⁺ and CD8⁺ T-cells in peripheral blood following humanization procedure for CCST and BLT models. (D) Proportions of human CD45⁺, CD3⁺, as well as (E) CD4⁺ and CD8⁺ T-cells in tissues of CCST and BLT mice at 25weeks post-humanization, as measured by flow cytometry, respectively. The Mann-Whitney's test was applied to compare ranks of two groups; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, n.s. = not significant.

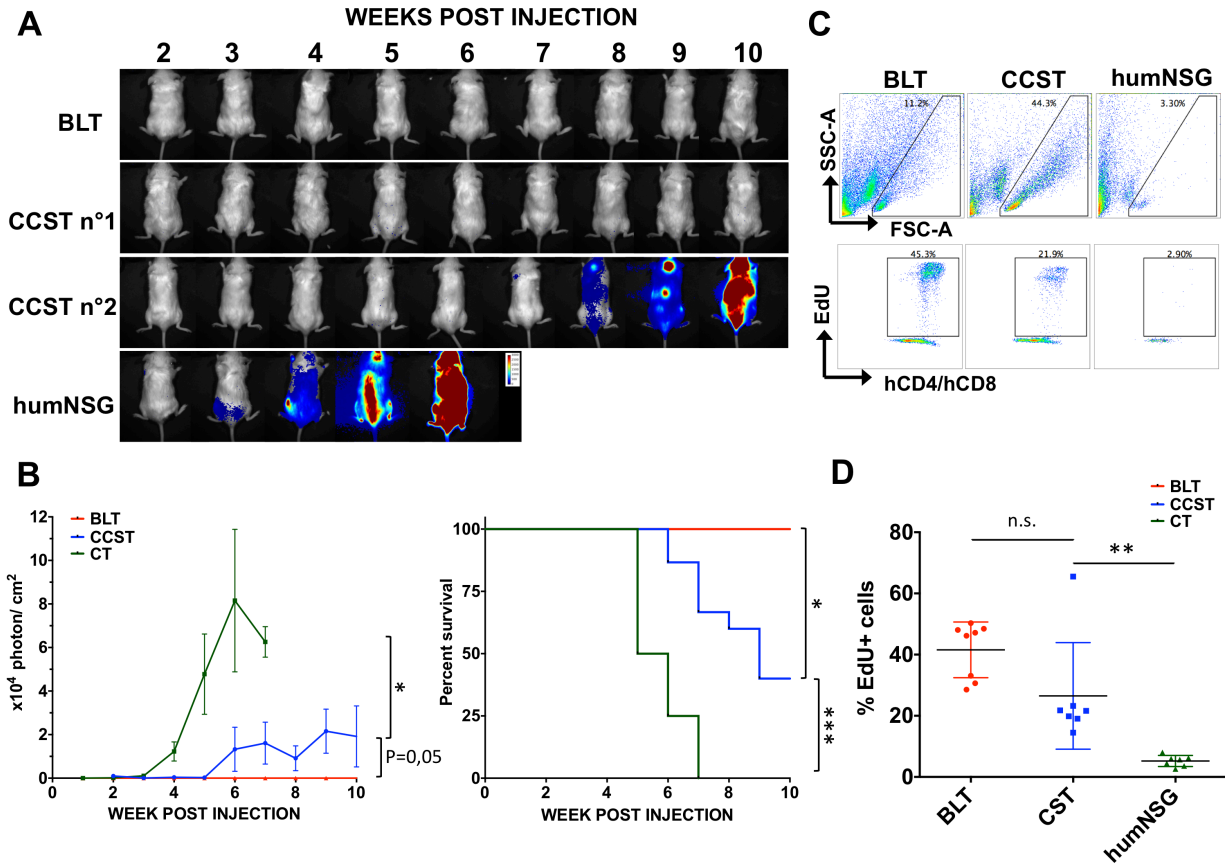


Figure 3. Functional T-cells are developing in CCST and BLT mice.

(A) Pre-B leukemic cell line REH expressing luciferase were injected in the three humanized models and imaged weekly by injecting D-luciferin to follow the progression of the leukemic cells. (B) Presence of the leukemic cells was measured by the intensity of the luciferin expression and expressed in photon per cm^2 (left). All BLT mice were able to fully reject leukemic cells (red) as no luciferin signal was detected and survival was at 100%. CCST mice were able to control leukemic cell growth in 50% of mice, and a delay in the tumor progression was observed in the remaining 50% of tested mice (blue line). Humanized mice without thymus were not able to prevent the proliferation of leukemic cells and luciferin signal was detectable after 2 to 3 weeks post injection (green line). All humanized mice without thymus died after 5 to 6 weeks (right panel). Survival curves show a significant difference in survival of BLT over the two other models ($p < 0.0001$ against humNSG and $p < 0.05$ against CCST) while CCST survive significantly longer than humNSG ($p < 0.0001$). (C) Proliferation capacity of peripheral blood T

cells isolated from the three models of humanized mice was tested by *in vitro* stimulation with 5 μ l/ml of PHA-L for 24hrs in presence of EdU. Representative flow cytometry plots are shown for each model. **(D)** Recapitulative of percentage of hCD4⁺hCD8⁺Edu⁺ in the three model of mice showing that T cells were able to proliferate significantly more in CCST and BLT mouse models, compared to humanized mice without thymus graft ($p < 0.01$), while there was no significative difference between BLT and CCST T-cell proliferation. The Mantel-Cox test was applied to compare two survival curves and the Mann-Whitney's test was applied to compare ranks of two groups; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, n.s. = not significant.

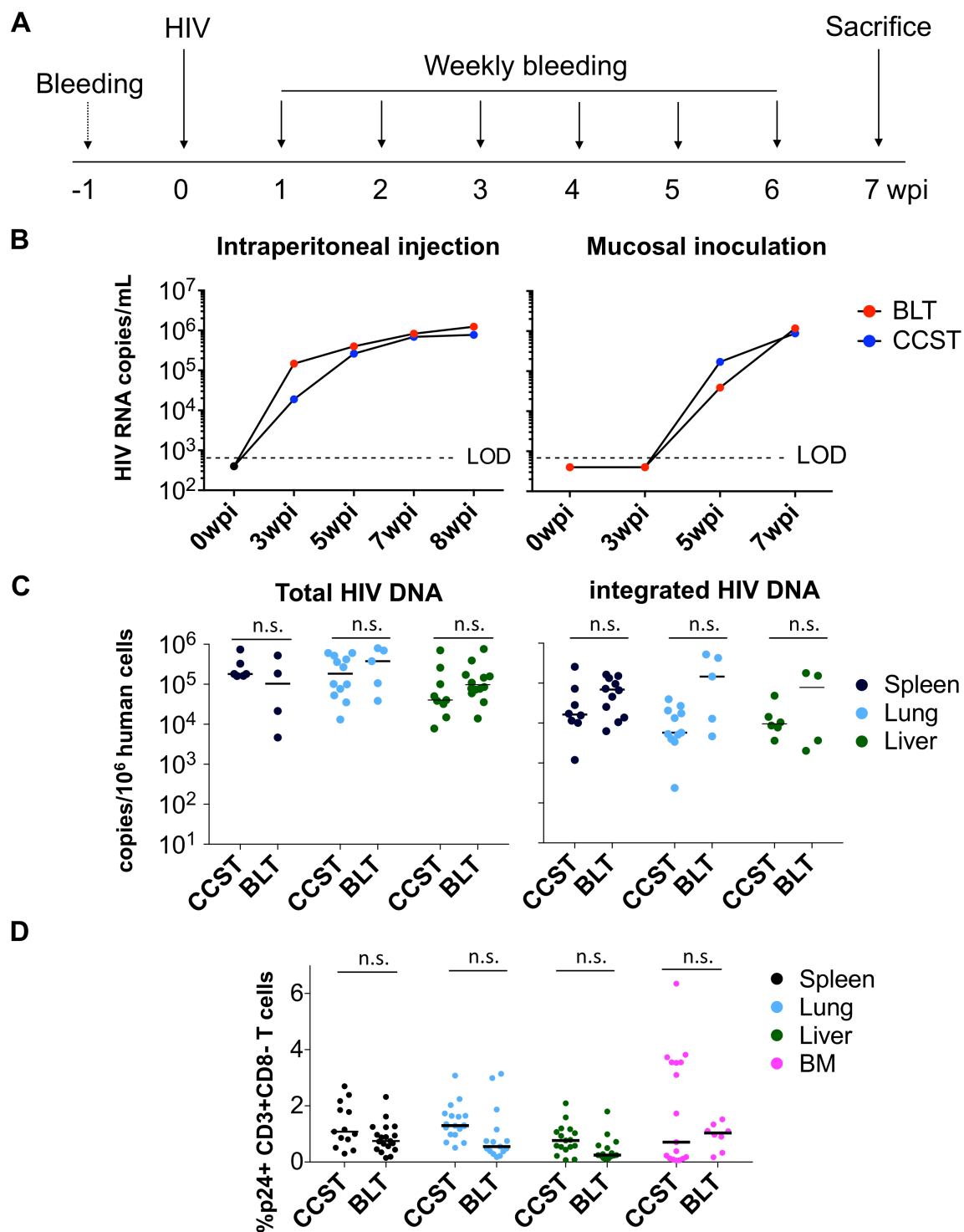


Figure 4. CCST mice can be infected by HIV-1 and are comparable to the BLT mouse model.

(A) CCST and BLT mice were infected with 200,000 TCID₅₀ of NL4.3-ADA-GFP HIV-1 via intraperitoneal injection or vaginal inoculation and monitored for 7 weeks. (B) Viral load measured in CCST and BLT in mouse plasma following HIV-1 infection. Shown are median values from 9 to 19 (depending on the time point) CCST and 15 BLT mice injected intraperitoneally, and 7 CCST and 6 BLT mice inoculated vaginally. (C) Levels of total and integrated HIV DNA in the spleen, lung and liver, quantified by real-time PCR. PCR quantification was performed between 11- and 13-weeks post-infection. (D) Frequency of the infected human CD4⁺ T-cells in spleen, lung, liver and bone marrow that are also expressing p24, as measured by flow cytometry. The Mann-Whitney's test was applied to compare ranks of two groups; n.s. = not significant. wpi = weeks post infection. LOD - limit of detection.

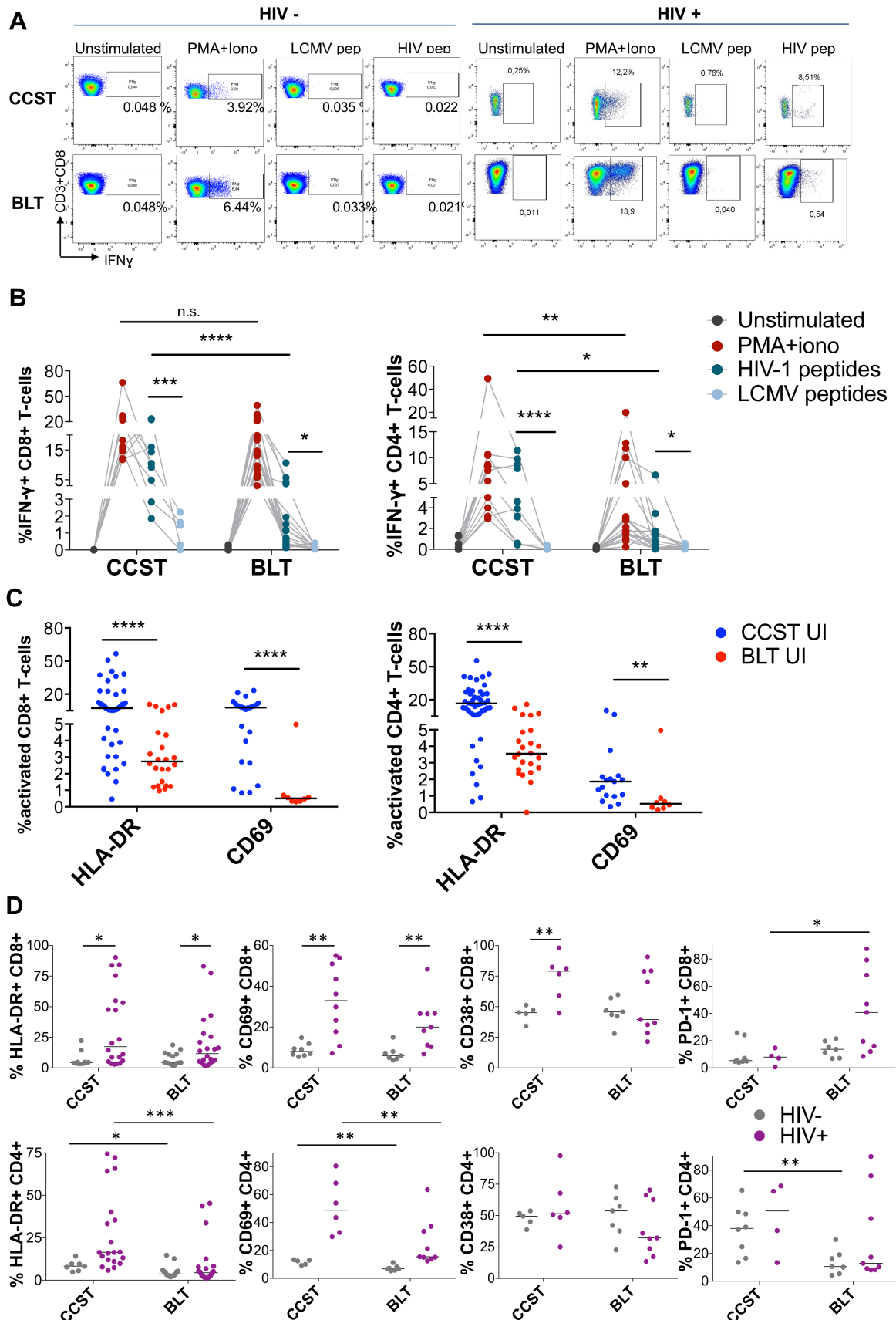


Figure 5. HIV-1-specific T-cell response is more robust in CCST mice compared to BLT mice.

(A) Splenocytes from CCST and BLT mice were stimulated with PMA (50 ng/mL) plus ionomycin (500 ng/mL) for 1 hour, or either pooled Clade B HIV-1 peptides (env, gag, pol, nef) (2 µg/mL) or LCMV peptides (GP61-80, GP276-286) (100 ng/mL) overnight, or kept untreated (unstimulated). Frequencies of IFN γ -expressing human T-cells were then measured by intracellular flow cytometry. Splenocytes from uninfected mice and LCMV stimulation were used to ensure the specificity of the assay. Representative dot plots are shown. (B) General functional capacity and HIV-1-specific response of human CD8⁺ and CD4⁺ T-cells from CCST (n=10) and BLT (n=12) mice (four dots connected with a line represent an individual mouse). (C) T-cell expression of HLA-DR and hCD69 activation marker in the blood of uninfected CCST and BLT mice, as measured by flow cytometry. (D) T-cell expression of HLA-DR, hCD69, hCD38 and hPD-1 activation marker in spleen of uninfected (gray dots) and infected (pink dots) CCST and BLT mice, as measured by flow cytometry. The Mann-Whitney's test was applied to compare ranks of two groups; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, n.s. = not significant.

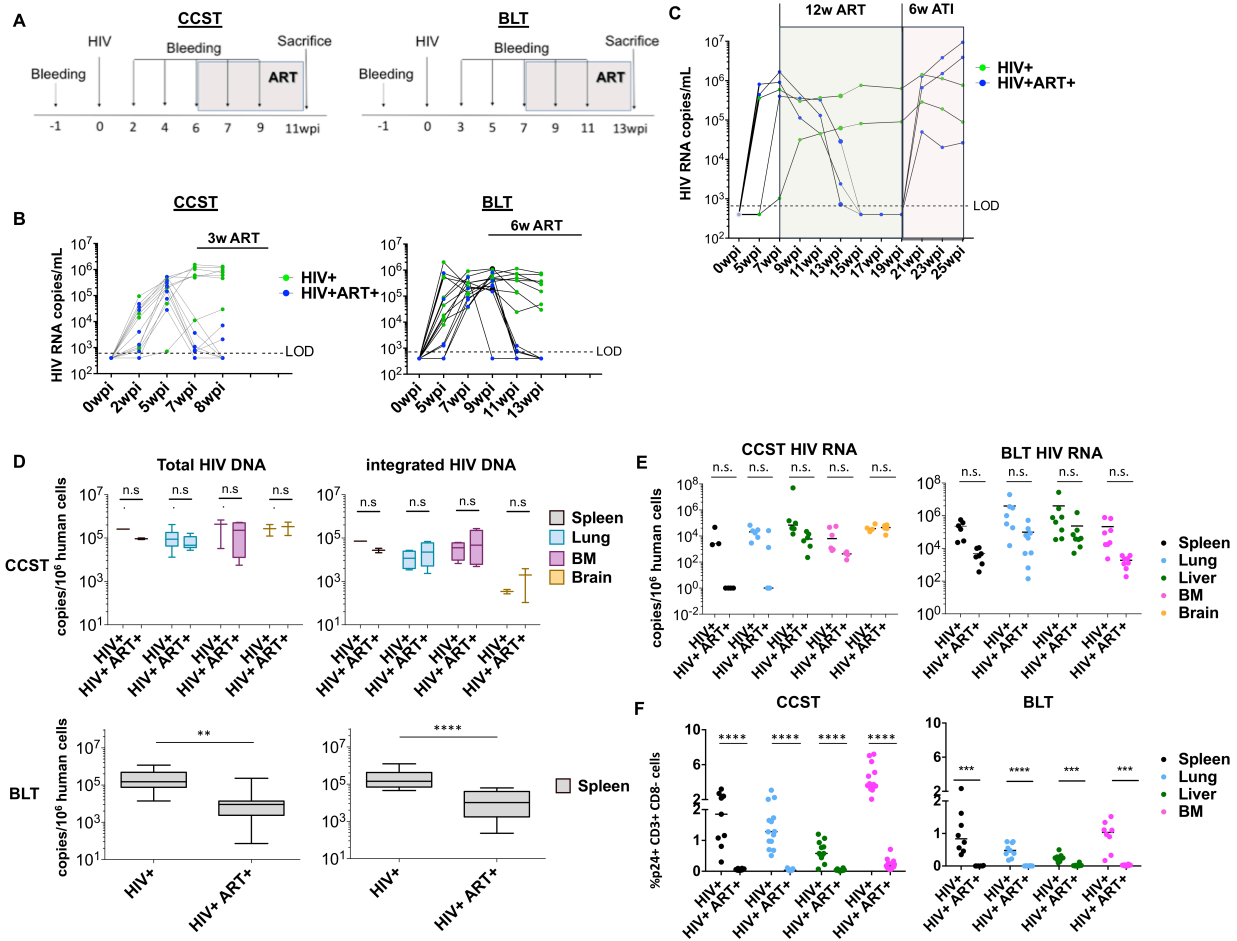
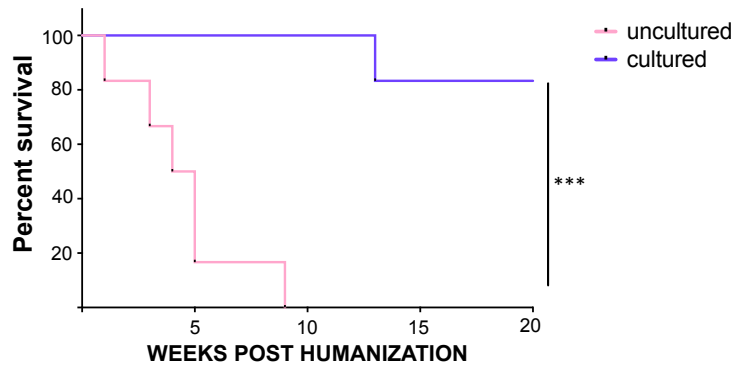


Figure 6. Establishment of HIV-1 latency in the CCST mouse model.

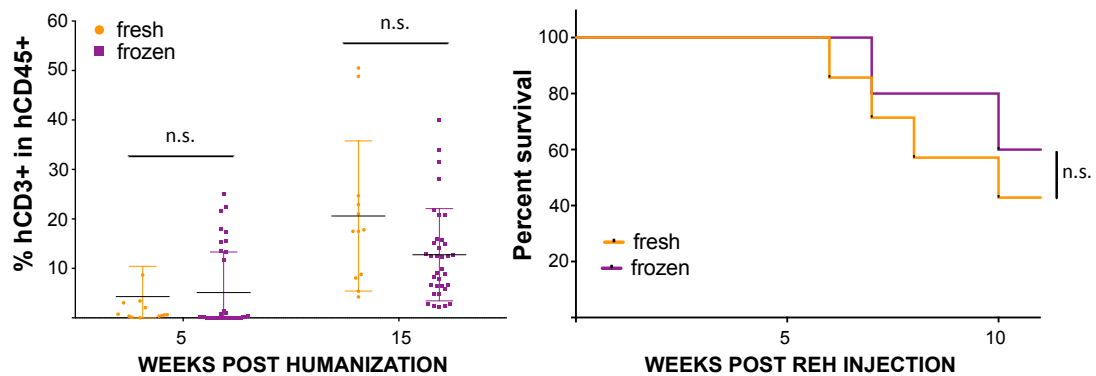
(A) CCST mice were injected intraperitoneally with 200,000 TCID₅₀ of NL4.3-ADA-GFP HIV-1. Three-week long daily ART, consisting of emtricitabine (100 mg/kg weight), tenofovir (50 mg/kg) and raltegravir (68 mg/kg), was initiated at 5wpi for a group of mice and maintained until the sacrifice. Control group was represented by untreated mice. (B) Dynamic changes in plasma viral load following HIV-1 infection and after initiation of ART. (C) Panel shows latency in CCST, as antiretroviral therapy interruption (ATI) results in detectable and rapid raise in HIV-1 viral load that reached levels of untreated mice. (D) HIV total and integrated DNA level in tissues of untreated CCST and BLT mice, as compared to the treated group. (E) HIV-1 RNA levels in tissues of untreated CCST and BLT mice, as compared to the treated group. (F) Effect of ART on the frequency of CD4⁺ T-cells in tissues expressing viral protein p24. The Mann-Whitney's test was applied to compare ranks of two groups; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, n.s. = not significant.

VII.2. Supplemental figures and tables

A



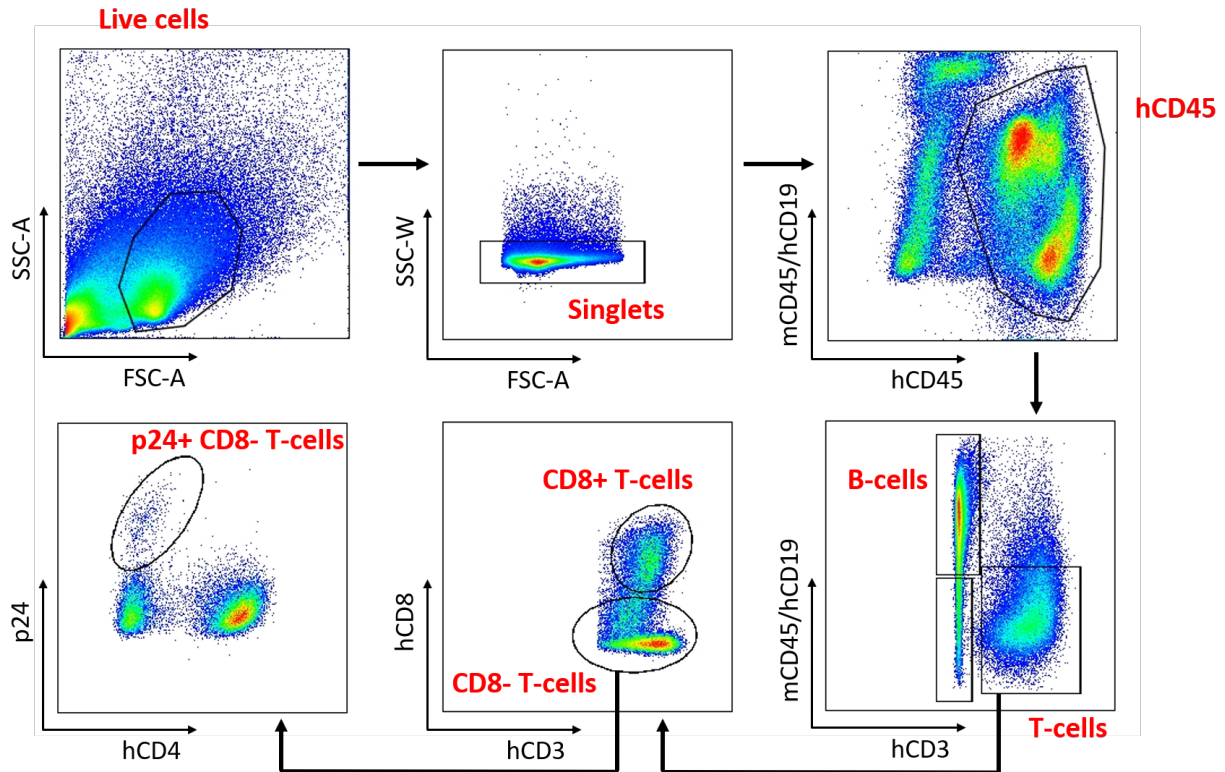
B



Supplemental Figure 1. Comparison of the different treatments used before transplanting the cardiac surgery thymus in mouse.

(A) Upon reception, one human paediatric thymus obtained from cardiac surgery was cut in small pieces and was either implanted directly in the quadriceps muscle of NSG mice humanized with CD34⁺ from cord blood (uncultured, $n=6$) or put in culture (as explained in Figure 1) for 7 days before being implanted in the quadriceps muscle of humanized NSG mice (cultured, $n=6$). All mice that received uncultured thymus died within 9 weeks from severe GvHD symptoms, while all mice except one with cultured thymus survived. We then used this condition in the following experiments. (** $p<0.0001$). **(B)** After being cut in small pieces, cardiac surgery thymus can be either put in culture for a direct use or be frozen in human serum

+ 10% DMSO and stored in liquid nitrogen. CCST mice made with fresh or frozen tissues didn't show significant difference in reconstitution level of hCD3⁺hCD45⁺ cells (left) and didn't show significant difference in the control of leukemia as shown by death rate after a REH challenge (right). The Mantel-Cox test was applied to compare two survival curves and the Mann-Whitney's test was applied to compare ranks of two groups; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, n.s. = not significant.



Supplemental Figure 2. Gating strategy for flow cytometry analysis to identify human immune cell subsets, including HIV-infected T-cells.

Single cells were isolated from peripheral blood or tissues and stained with a mixture of fluorescent-labeled antibodies according to the cell surface staining protocol. Total human immune cell population was identified using anti-human CD45 antibodies and further characterized as B-cells ($hCD45^+CD19^+$), monocytes ($hCD45^+CD14^+$), T-cells ($hCD45^+CD3^+$) and their subtypes, $CD8^+$ T-cells ($hCD45^+CD3^+CD8^+$) and $CD4^+$ T-cells (identified as $hCD45^+CD3^+CD4^+$ in uninfected mice and $hCD45^+CD3^+CD8^-$ in HIV-1-positive mice as HIV downregulates CD4). To analyze T-cells infected with HIV-1, cells were permeabilized, and intracellular staining with anti-p24 antibody was performed. HIV-infected T-cells were subsequently gated as $hCD45^+CD3^+CD8^+p24^+$. Shown is the flow cytometry analysis of spleen cells from a representative HIV-infected CCST mouse.

VIII. References

1. S. Garcia, A. A. Freitas, Humanized mice: current states and perspectives. *Immunology letters* **146**, 1-7 (2012).
2. T. Matsumura *et al.*, Functional CD5+ B cells develop predominantly in the spleen of NOD/SCID/gammac(null) (NOG) mice transplanted either with human umbilical cord blood, bone marrow, or mobilized peripheral blood CD34+ cells. *Exp Hematol* **31**, 789-797 (2003).
3. P. Lan, N. Tonomura, A. Shimizu, S. Wang, Y. G. Yang, Reconstitution of a functional human immune system in immunodeficient mice through combined human fetal thymus/liver and CD34+ cell transplantation. *Blood* **108**, 487-492 (2006).
4. H. Kalscheuer *et al.*, A model for personalized in vivo analysis of human immune responsiveness. *Science translational medicine* **4**, 125ra130 (2012).
5. W. J. Morrow, M. Wharton, D. Lau, J. A. Levy, Small animals are not susceptible to human immunodeficiency virus infection. *J Gen Virol* **68** (Pt 8), 2253-2257 (1987).
6. S. Watanabe *et al.*, Hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL2Rgamma null mice develop human lymphoid systems and induce long-lasting HIV-1 infection with specific humoral immune responses. *Blood* **109**, 212-218 (2007).
7. N. Holt *et al.*, Human hematopoietic stem/progenitor cells modified by zinc-finger nucleases targeted to CCR5 control HIV-1 in vivo. *Nat Biotechnol* **28**, 839-847 (2010).
8. A. Joseph *et al.*, Inhibition of in vivo HIV infection in humanized mice by gene therapy of human hematopoietic stem cells with a lentiviral vector encoding a broadly neutralizing anti-HIV antibody. *J Virol* **84**, 6645-6653 (2010).

9. P. W. Denton, J. V. Garcia, Humanized mouse models of HIV infection. *AIDS Rev* **13**, 135-148 (2011).
10. T. Hatzioannou, D. T. Evans, Animal models for HIV/AIDS research. *Nat Rev Microbiol* **10**, 852-867 (2012).
11. D. M. Brainard *et al.*, Induction of robust cellular and humoral virus-specific adaptive immune responses in human immunodeficiency virus-infected humanized BLT mice. *J Virol* **83**, 7305-7321 (2009).
12. P. W. Denton *et al.*, Antiretroviral pre-exposure prophylaxis prevents vaginal transmission of HIV-1 in humanized BLT mice. *PLoS Med* **5**, e16 (2008).
13. Z. Sun *et al.*, Intrarectal transmission, systemic infection, and CD4+ T cell depletion in humanized mice infected with HIV-1. *J Exp Med* **204**, 705-714 (2007).
14. P. W. Denton *et al.*, Systemic administration of antiretrovirals prior to exposure prevents rectal and intravenous HIV-1 transmission in humanized BLT mice. *PLoS One* **5**, e8829 (2010).
15. P. W. Denton *et al.*, Generation of HIV latency in humanized BLT mice. *J Virol* **86**, 630-634 (2012).
16. M. L. Markert *et al.*, Thymus transplantation in complete DiGeorge syndrome: immunologic and safety evaluations in 12 patients. *Blood* **102**, 1121-1130 (2003).
17. M. L. Markert, B. H. Devlin, E. A. McCarthy, Thymus transplantation. *Clin Immunol* **135**, 236-246 (2010).
18. M. E. Brown *et al.*, A Humanized Mouse Model Generated Using Surplus Neonatal Tissue. *Stem Cell Reports* **10**, 1175-1183 (2018).

19. M. L. Markert, B. H. Devlin, I. K. Chinn, E. A. McCarthy, Y. J. Li, Factors affecting success of thymus transplantation for complete DiGeorge anomaly. *Am J Transplant* **8**, 1729-1736 (2008).
20. M. Wadman, The truth about fetal tissue research. *Nature* **528**, 178-181 (2015).
21. V. P. Dave, F. Hajjar, M. M. Dieng, E. Haddad, E. A. Cohen, Efficient BST2 antagonism by Vpu is critical for early HIV-1 dissemination in humanized mice. *Retrovirology* **10**, 128 (2013).
22. C. Vandergeeten *et al.*, Cross-clade ultrasensitive PCR-based assays to measure HIV persistence in large-cohort studies. *J Virol* **88**, 12385-12396 (2014).

CHAPITRE 5 - DISCUSSION

En marge d'optimiser et améliorer la reconstitution et l'utilisation des souris BLT, ce projet avait aussi pour but de créer un nouveau modèle de souris humanisées similaire à la BLT, c'est-à-dire greffé avec un organoïde thymique pour permettre l'éducation des lymphocytes T dans un contexte HLA, en utilisant des souris immunodéficientes sans utiliser de tissu foetal. Ainsi, en utilisant des HSC issus de sang de cordon co-greffés avec des morceaux de thymus humain excisé lors de chirurgie cardiaque pédiatrique dans des souris NSG, nous avons obtenu une reconstitution immunitaire en périphérie satisfaisante avec une apparition précoce de lymphocytes T. Les lymphocytes T de ces souris ont été capables *ex vivo* de proliférer de manière significativement plus forte que les souris humanisées sans thymus et ont pu rejeter une lignée leucémique allogénique *in vivo*, comme les souris BLT. L'utilisation majeure de la BLT se faisant dans le domaine du VIH, nous avons ensuite montré que les souris CCST pouvaient être infectées par le virus par voie intrapéritonéale et par voie vaginale, et sont ainsi capables de reconnaître des peptides du VIH. Par ailleurs, lors de la mise en place d'une thérapie rétrovirale, la quantité de VIH a diminué *in vivo*, montrant ainsi la capacité de ces souris à reproduire un modèle de latence du virus. Cependant, nous avons observé une variabilité de la réponse et de l'efficacité de ces souris d'un groupe à l'autre, nécessitant donc des études supplémentaires pour comprendre et réduire ces disparités entre le modèle CCST et BLT (tableau III). Le développement de modèle alternatif à la BLT, aussi performant mais qui n'utilise pas de tissus foetal, devient aujourd'hui une priorité en raison de la controverse de plus en plus importante sur l'utilisation d'un tel type de tissu.

Tableau III. Comparaison des différents modèles de souris humanisées

modèle	humNSG	BLT	CCST
Source des cellules	1-2x10 ⁵ CD34+ issues de sang de cordon	- 5x10 ⁵ CD34+ issues de foie fœtal - thymus fœtal autologue	- 1-2x10 ⁵ CD34+ issues de sang de cordon - thymus issu de chirurgie cardiaque pédiatrique
Méthodes d'humanisations	Injection intraveineuse	- Injection intraveineuse des CD34+ - Co-greffe du thymus sous la capsule rénale	- Injection intraveineuse des CD34+ - Co-greffe du thymus dans le muscle quadriceps
avantages	- Développement multilignage des cellules hématopoïétiques humaines - Generation d'un système immunitaire naïf	- Développement multilignage des cellules hématopoïétiques humaines - Generation d'un système immunitaire naïf - Cellules T éduqués dans un contexte HLA - autologue	- Développement multilignage des cellules hématopoïétiques humaines - Generation d'un système immunitaire naïf - Cellules T éduqués dans un contexte HLA - Pas de nécessité de matcher le thymus avec les CD34+
défauts	- pas de T éduqués dans un contexte HLA → fonction très partielle		

I. L'optimisation du modèle des souris humanisées

Les souris humanisées, qui sont relativement simples, reproductibles, de petites tailles et moins coûteuse à produire, peuvent donc fournir un moyen de mieux comprendre la physiopathologie du VIH et de tester de nouvelles thérapies. L'accès aux tissus fœtaux et ainsi à la production de souris BLT a permis d'approfondir les connaissances de l'infection par le VIH. Notre étude a permis de montrer que l'infection par le VIH induisait une diminution des pDC dans le sang et les tissus lymphoïdes de l'intestin et de la rate. Ensuite, en utilisant une forme soluble du ligand Flt3L, une expansion et une mobilisation efficaces des DC chez des souris humanisées a été observée, associées à une infection du VIH retardée et à une réduction virale significatives. Cet effet antiviral de Flt3L est contrôlé par une signalisation IFN-I plus

importante. Par ailleurs, nous avons observé que les pDC mobilisés par Flt3L étaient plus efficaces pour répondre aux agonistes de TLR7, entraînant une production plus élevée d'IFN α , même après une infection par le VIH. Ainsi, les résultats de notre travail démontrent clairement que les pDC jouent un rôle protecteur au tout début de l'infection. Dans ce contexte, nous montrons que la compréhension des événements initiaux qui déterminent la transmission et la persistance du VIH pourrait aider au développement d'une ou de plusieurs approches thérapeutiques basées sur les pDC pour compléter les stratégies anti-VIH conventionnelles. Les souris BLT sont donc un modèle de choix pour étudier les stratégies de persistance, d'induction et d'élimination du VIH dans le but d'éradiquer les cellules infectées par le VIH et ce même dans des sous ensemble de populations moins développé chez ces souris tels que les pDCs.

En résumé, les modèles de souris humanisées ont largement contribué à l'étude de pratiquement tous les aspects du VIH et du SIDA. Ils ont été particulièrement utiles pour l'étude de la réplication, de la pathogenèse, de la transmission, de la prévention et, plus récemment, du traitement du VIH. Cependant, le potentiel de ces souris humanisées, incluant le modèle CCST présenté ici, est diminué par des limites intrinsèques aux modèles, telles qu'un développement partiel de certaines populations comme les cellules NK⁴⁰¹ ou de la fonction comme les lymphocytes B⁴⁰². Par ailleurs, l'absence de cytokines humaines essentielles à la prise de greffe et à la différenciation des HSC est un frein à la maturation optimale des cellules immunitaires³⁸. Ainsi, l'optimisation de modèles murins humanisés profiterait sans aucun doute au domaine de la recherche sur le VIH.

I.1. Les souris humanisées et les lymphocytes B

Les souris BLT pour l'étude de VIH ont déjà été largement utilisé et ont permis d'apprendre beaucoup sur le virus, son infection, sa réplication et pour tester des thérapies. Cependant, les cellules B représentent un paradigme très intéressant dans ces modèles humanisées. D'une part, elles peuvent repeupler des souris humanisées à des niveaux extrêmement élevés, même en l'absence totale de lymphocytes T humains. D'autre part, elles ne produisent pratiquement pas d'IgG et, pour la plupart, ne développent pas de réponses immunitaires dépendantes des cellules T. L'incapacité des souris BLT à produire des taux élevés d'anticorps d'IgG hyper-mutés et à permettre les changements de classe est donc probablement

l'une des limites les plus importantes de ce modèle. Bien que des anticorps humains spécifiques au HIV aient été observés chez des souris BLT à la suite d'une infection^{95,97}, leurs concentrations sont généralement assez faibles et les anticorps présentent des taux de recombinaison et de mutation de classe limités. Il n'y a donc pas de réponses immunitaires humorales robustes chez les souris BLT. Une explication pourrait être que comme seuls des HSC issues du foie fœtal sont greffés, il n'y a pas de reconstitution des cellules d'origine non-hématopoïétique, y compris les cellules stromales qui sont essentielles à l'immunité humorale adaptative. Les cellules stromales, dérivées de précurseurs mésenchymateux plutôt que hématopoïétiques, sont des composants immunomodulateurs essentiels du système immunitaire⁴⁰³, et leur absence chez les souris humanisées BLT peut être une explication pour l'absence de formation de centres germinaux et du dysfonctionnement des anticorps. En effet, la production d'anticorps par les centres germinaux dépend de manière critique de la présence de cellules stromales spécifiques : les cellules réticulaires fibroblastiques, les cellules réticulaires marginales et les cellules dendritiques folliculaires. Ces cellules jouent un rôle essentiel dans l'organisation, le maintien et la fonction des lymphocytes dans les tissus lymphoïdes secondaires⁴⁰⁴. Les cellules dendritiques folliculaires en particulier, sont cruciales pour la régulation correcte de la formation du follicule, la maintenance du centre germinale, la maturation d'affinité et la survie des cellules B activées^{405,406}. Par conséquent, l'absence de ces cellules humaines chez les souris BLT contribue probablement à l'incapacité de générer et de maintenir des follicules de cellules B intacts. Une solution possible au manque de développement du centre germinale pourrait être d'injecter aussi des cellules précurseurs mésenchymateuses en même temps les HSC, soit sous la forme de cellules mésenchymateuses cultivées à partir du tissu hépatique du donneur, soit sous la forme d'un organoïde splénique greffé, similaire à l'organoïde thymique. Cela représenterait une opportunité unique d'apprendre des détails clés sur les complexités qui régulent le développement des cellules plasmatisques, qui permettront d'améliorer ces modèles tout en offrant un nouveau moyen d'étudier d'autres aspects fondamentaux du système immunitaire humain. Malheureusement, jusqu'ici aucune étude n'a permis un développement optimal des populations de lymphocyte B et de leur fonction.

1.2. Le rôle des cytokines dans les souris humanisées

La compréhension de l'interaction détaillée entre le système immunitaire humain et les tissus de souris est au cœur des recherches aujourd'hui afin de permettre une meilleure compréhension de la façon dont les cellules humaines réagissent aux antigènes de souris. Ainsi, cela pourrait contribuer à la création de modèles dans lesquels les cellules des deux espèces pourront coexister de manière plus optimale. Il existe de nombreuses études mettant en évidence le besoin de certaines cytokines pour le développement, la survie et le maintien des lignées hématopoïétiques humaines. À ce jour, les efforts ont montré qu'une expression non régulée de ces molécules peut améliorer les niveaux de types de cellules spécifiques. Cependant, une expression mal contrôlée peut avoir des conséquences inattendues et hautement indésirables. Par exemple, chez les souris humanisées, les structures lymphoïdes secondaires sont manquantes ou incomplètes, en partie à cause de l'absence de cytokines nécessaires à leur bon développement^{407,408}. Bien que l'utilisation de souris ayant un fond génétique $Il2rg^{-/-}$ augmente la tolérance à la transplantation de cellules humaines, elle a également pour effet secondaire de limiter le développement de tissus lymphoïdes secondaires chez ces souris⁴⁰⁹. Étant donné le rôle critique des tissus lymphoïdes secondaires dans le développement d'anticorps matures, il pourrait être nécessaire d'explorer d'autres méthodes d'utilisation des souris $Il2rg^{-/-}$. Cela a des conséquences directes sur la réponse humorale, résultant en des défauts dans les changements de classes et dans les maturations d'affinité post-immunisation. Pour y remédier, des cellules inductrices de tissus lymphoïdes pourraient être introduites⁴¹⁰. Une autre alternative étudiée est d'utiliser des cellules de foie fœtal ainsi que des cellules qui supportent la croissance des cellules du foie fœtal accompagnées d'une supplémentation en cytokines IL-1 β , IL-2, IL-7, et GM-CSF. Cela permet d'améliorer la maturation et la différenciation des HSC et donc d'optimiser la production et la fonction de cellules immunitaires tels que les macrophages, les DC folliculaires et les cellules Th^{44,411}. En effet, l'absence de cytokines humaines essentielles compromet la prise de greffe, la différenciation et la maturation optimale des HSC et des cellules immunitaires fonctionnelles. Par exemple, dans les souris BLT, il n'y a pas ou peu de cellules NK humaines et d'hématies malgré une reconstitution significative de DC, de monocytes et macrophages. Une étude a remarqué que plusieurs cytokines, incluant l'IL-15, le GM-CSF, l'IL-4, le M-CSF et IL-3, requises pour le développement et le maintien des

populations de NK et de cellules myéloïdes, montrent une divergence de séquence significative entre l'homme et la souris. Par ailleurs, d'autres études antérieures ont montré que les cytokines murines ont un effet moindre sur les cellules humaines. Comme ces cytokines sont majoritairement produites par des cellules non hématopoïétiques, le manque de cytokines humaines peut expliquer la reconstitution pauvre en cellules NK et en cellules myéloïdes dans les souris humanisées. Cette même étude a montré que ces modèles peuvent être améliorés en fournissant des plasmides codant pour des cytokines humaines⁴¹¹. Plus récemment, plusieurs modèles murins immunodéficients ont été modifiés pour exprimer des cytokines humaines, tels que les SGM3 et les MISTRG présentés précédemment, mais cela nécessite encore beaucoup d'optimisation.

Cependant, malgré cette amélioration, l'action des cytokines humaines peut être altérée par les cytokines résiduelles de la souris ou pourrait induire la prolifération des cellules murines résiduelles et ainsi remplacer la greffe de cellules humaines et ce en raison de la réactivité croisée entre certaines cytokines humaines et de souris.

D'autres déplétions de gènes peuvent être faites dans les souris immunodéficientes actuelles pour réduire la fonction de cellules immunitaires murines, comme les hématies, les macrophages et les granulocytes^{412,413}. Cependant, en raison du faible développement d'hématies humaines, une réduction importante des hématies murines peut résulter en une anémie sévère chez les souris, réduisant ainsi leur durée de vie et leurs aptitudes, comme cela a été observé chez les souris MISTRG¹²⁰. L'élimination complète de ce problème nécessiterait donc une déplétion complète des cellules murines ou l'introduction de cytokines et de facteurs de croissance de haute affinité spécifiques pour l'homme.

I.3. Les souris humanisées et les cellules NK

Une autre population d'intérêt dont le développement n'est pas optimal dans les BLT sont les cellules NK. Les cellules NK représentent 10 à 15% des lymphocytes dans le sang humain tandis que chez la BLT, elles atteignent rarement des niveaux supérieurs à 1 à 3% des cellules hCD45+ humaine¹⁴⁵. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer la faible reconstitution des cellules NK humaines dans ces modèles. L'une d'entre elle est que la production d'IL-15

diffère selon les différentes souches de souris utilisées. Les souris NOD ont un allèle IL-15 défectueux, qui contribue normalement au défaut des cellules NK chez cette souche mais pourrait également affecter le développement des cellules NK humaines chez les souris humanisées⁴¹⁴. En effet, il a été montré que l'IL-15 murin peut réagir avec les cellules NK humaines⁴¹⁵, mais la réponse reste faible comparée à celle obtenue en présence d'IL-15 humain. Cependant, l'allèle IL-15 des souris ayant un fond génétique BALB/c est fonctionnel et pourtant le niveau de reconstitution cellules NK humaines chez les souris BRG humanisées n'est pas considérablement meilleur par rapport aux souris NSG. Cette observation semble donc éliminer la possibilité que l'IL-15 de souris soit lié au développement des cellules NK humaines chez les souris humanisées. Par ailleurs, il a été démontré que le traitement exogène de souris humanisées avec de l'IL-15 humaine améliorerait fortement le développement et la fonction des cellules NK humaines^{411,416}. Ainsi, les approches visant à augmenter la production ou la présentation de l'IL-15 vont améliorer l'homéostasie des cellules NK humaines chez la souris humanisées. Une autre raison possible du faible développement des cellules NK humaines chez les souris BRG humanisées pourrait être la phagocytose des cellules NK humaines en raison de l'absence d'interaction SIRP α murin/CD47 humain empêchant la mise en place du signe « don't eat me »⁴⁹. Cette hypothèse a été testée en utilisant trois approches différentes: l'expression induite du CD47 murin sur des cellules humaines avant reconstitution de souris BRG ou par la création de souris BRG exprimant le SIRP α humain ou exprimant le SIRP α des souris NOD^{52,53}. Dans toutes ces études, le nombre de cellules NK humaines a considérablement augmenté même si les fréquences de ces cellules restent faibles comparées à celles observées dans le sang périphérique humain. Il est clair que d'autres mécanismes jouent des rôles importants dans le développement des cellules NK chez les souris humanisées et donc que des travaux supplémentaires sont nécessaires pour mieux les comprendre. Aujourd'hui on ignore encore si des réponses de cellules NK anti-VIH se produisent chez des souris humanisées infectées, en partie à cause de la reconstitution inadéquate des cellules NK humaines chez les souris humanisées en général. Certaines des stratégies mentionnées plus haut visant à stimuler le développement des cellules NK chez les souris humanisées devraient faciliter l'étude des cellules NK au cours d'une infection par le VIH, quelques études préliminaires ont déjà commencé à investiguer certaines stratégies^{417,418}. Comme expliqué dans l'introduction, ce n'est pas toujours pas clair si les cellules NK sont bénéfiques ou nuisibles pour le contrôle de

l'infection par le VIH. Les souris humanisées offriraient donc un moyen de disséquer le rôle des cellules NK dans la biologie du VIH. Par ailleurs, l'absence de NK dans le modèle BLT a été utilisée comme un avantage dans notre étude concernant l'utilisation d'iPSC *in vivo* en médecine régénérative afin de comprendre si la présence ou non des cellules NK impactait la formation des tératomes.

I.4. Les souris humanisées et la médecine régénérative

En plus de leur rôle majeur dans le domaine du VIH, qui ne cesse de grandir, les souris humanisées peuvent jouer un rôle important dans le domaine de la médecine régénérative. L'une des études dans cette thèse a ainsi montré que ces souris peuvent être utilisées pour étudier l'immunogénicité des iPSC et de leur faculté à créer des tératomes. Il a ainsi été montré que les iPSC humaines sont la cible des cellules NK chez des souris humanisées. En opposition à ce qui a été trouvé en utilisant iPSC murines, les cellules NK humaines pourraient donc empêcher la formation de tératomes sans activation préalable.

Plus généralement, les études menées sur les iPSC sont prometteuses pour le remplacement cellulaire et tissulaire en clinique. Par conséquent, pour exploiter le potentiel des iPSC humaine en thérapie cellulaire humaine, il est important d'évaluer l'immunogénicité de ces cellules. Les souris immunodéficientes constituent donc le modèle animal de référence pour tester l'innocuité et l'efficacité des cellules et des tissus humains dérivés des cellules iPSC avant de se rendre à la clinique. Cela pourrait représenter une véritable opportunité pour de la médecine de précision, car chaque traitement de cellules pourrait théoriquement être constitué des cellules et des tissus d'un individu dérivés de leurs iPSC. Pour que cela devienne une réalité, par exemple dans le domaine du diabète, de nombreux laboratoires ont signalé leur capacité à fabriquer des cellules de type bêta à partir de cellules iPSC et ont utilisé des souris immunodéficientes pour tester leur fonctionnalité *in vivo*⁴¹⁹⁻⁴²². Enfin, pour tester leur fonction en présence d'un système immunitaire T1 autologue ou allogène, les souris humanisées sont actuellement les seuls modèles préclinique disponibles, car tout autre modèle animal immunocompétent montrerait une réponse xénogénique puissante aux cellules humaines plutôt qu'une réponse allogénique ou auto-immune.

II.5. Le singe vs les souris humanisées

Plus de 30 espèces africaines de primates non humains sont naturellement infectées par plus de 40 souches différentes de SIV^{227,423}, cependant les animaux infectés ne développent généralement pas la maladie de type SIDA⁴²⁴. En revanche, les primates non humains asiatiques macaques sont des hôtes non naturels du SIV et développent des maladies de type SIDA après infection^{425,426}. Ainsi, le rhesus macaque a été le plus largement utilisé dans la recherche sur le VIH-1. Outre leur proximité génétique, anatomique et physiologique avec l'homme, les macaques infectés par le SIV présentent des manifestations cliniques et pathogéniques similaire à l'homme infecté par le VIH-1, telles que réponses immunes innées et adaptatives des cellules CD8⁺^{237,427} et B⁴²⁸. Par conséquent, ce modèle a été largement utilisé pour l'étude de la transmission, l'immunopathogenèse du SIV afin que l'étude d'efficacité des vaccins. Cependant ce modèle a également plusieurs limites. D'une part, les macaques ne sont pas infectables par le VIH, seulement le SIV et éventuellement un virus chimère du SIV exprimant l'enveloppe et la reverse transcriptase du HIV^{429,430} (SVIH). Ensuite, le SIV est résistant à la plupart des thérapies approuvées par la FDA tels que les NNRTI⁴³¹ et certains inhibiteurs de la protéinase et de l'entrée⁴³², mettant en avant les différentes caractéristiques du VIH par rapport au SIV. D'ailleurs, Le SIV diffère du VIH-1 d'un point de vue génotypique et phénotypique, les vaccins conçus et testés dans un modèle en utilisant le SIV ou le VIH-1 ne peuvent donc pas être directement appliqués dans les essais cliniques sur l'homme^{433,434}. D'autre part, les macaques et les humains sont génétiquement différents, en particulier au niveau complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) et les récepteurs des cellules T (TCR) qui sont plus complexes chez les espèces macaques^{435,436}. Enfin, de nombreux pays interdisent ou restreignent sévèrement la recherche sur les grands singes en plus d'être extrêmement coûteux. Il existait donc un besoin urgent d'identifier d'autres modèles *in vivo* pouvant récapituler la cinétique de l'infection au VIH chez l'homme et qui peuvent permettre le développement de nouveaux traitements. Tous les modèles de souris humanisées actuellement disponibles sont capables d'être infectés par le VIH dans les cellules humaines présentes dans le sang et les tissus périphériques. Des réponses immunitaires innées et adaptatives au VIH ont été démontrées dans ces modèles et l'infection par le VIH répond aux mêmes médicaments que ceux utilisés pour traiter des patients humains. Comme pour tout modèle animal utilisé pour la recherche biomédicale, son utilisation dans les

études sur le VIH est limitée. Certaines limites sont intrinsèques à la taille et à la biologie de l'animal. En effet, à la différence du modèle SIV / macaques, le volume de plasma sanguin pouvant être obtenu pour l'analyse de la charge virale et la quantité limitée de cellules sanguines périphériques pouvant être utilisée pour l'analyse fonctionnelle *in vitro* sont relativement faible, en plus de l'espérance de vie relativement courte de l'animal. Cependant, les souris humanisées peuvent être considérées comme un modèle accéléré de l'infection par le VIH utile pour l'évaluation rapide de thérapie. Bien qu'il soit encore possible d'améliorer les réponses immunitaires humorales et cellulaires des souris génériques contre l'infection à VIH-1, ce modèle récapitule déjà de nombreux aspects essentiels de la transmission muqueuse, de la prévention, de l'immunopathogenèse, des traitements et la latence du virus. La nouvelle génération de modèles humanisées et SIV / macaque est donc complémentaire et permettra de contredire le fameux adage selon lequel «les souris mentent et les singes exagèrent» (attribué au Dr. David B. Weiner, University of Pennsylvania).

II. Le tissu fœtal en recherche

II.1. La controverse sur l'utilisation des tissus fœtaux en recherche aux Etats-Unis

Bien que la souris BLT soit aujourd'hui le modèle de souris humanisées le plus développé, y accéder est encore difficile. En effet, l'utilisation de tissus fœtaux à des fins de recherche soulève également un certain nombre de considérations éthiques, notamment le degré auquel une femme peut être influencée dans sa décision d'avorter si elle sait qu'elle peut faire don du tissu fœtal. Des préoccupations ont également été exprimées au sujet d'un conflit d'intérêts potentiel lorsqu'il existe un avantage financier pour les personnes impliquées dans la récupération, le stockage, le test, la préparation et la livraison de tissus fœtaux. À cela s'ajoute l'influence des mouvements basés sur différentes croyances concernant la décision et l'autorisation d'interruption volontaire de grossesse en elle-même.

C'est ainsi qu'aux Etats-Unis, en juin 2019, après une annonce du président Donald Trump, le département de la Santé et des Services Sociaux a annoncé que l'administration avait décidé de mettre fin aux projets de recherche internes impliquant des tissus fœtaux venant d'interruptions volontaires de grossesse au sein du National Institutes of Health (NIH)^{1,2}. De

même, il a indiqué qu'il exigerait un examen éthique supplémentaire pour les nouvelles recherches externes impliquant le tissu fœtal.

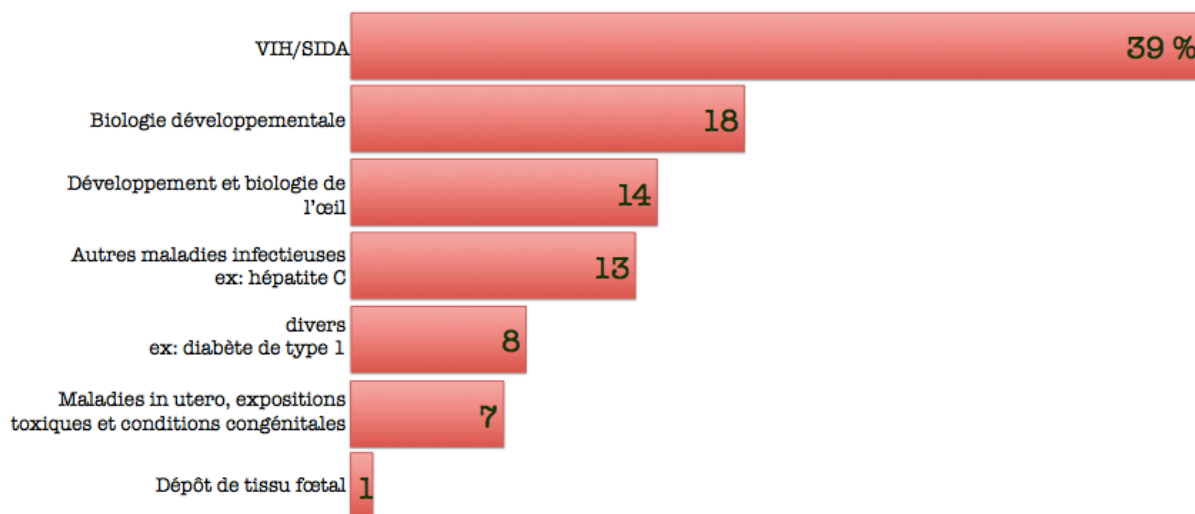


Figure 10. Les utilisations principales du tissu fœtal en recherche

Source : Nature News December 2015 doi:10.1038/528178a

En général, environ 10% des fonds alloués par le NIH vont à des chercheurs internes au NIH et plus de 80% du financement des NIH vont à des chercheurs externes d'universités et d'autres institutions, sous forme de subventions, de contrats et d'accords de coopération. En 2014, le NIH a financé 164 projets utilisant le tissu fœtal, principalement pour la recherche sur les maladies infectieuses, en particulier le VIH/sida (figure 10). Ainsi, à partir du mois d'octobre 2019, les scientifiques qui sollicitent une subvention devront justifier leur besoin en tissu fœtal et décrire comment il sera obtenu en expliquant pourquoi des solutions alternatives telles que le tissu adulte ne fonctionnent pas. Ensuite, si le NIH approuve une proposition de recherche de financement, le chercheur devra obtenir l'approbation d'un nouveau comité consultatif sur l'éthique nommé par le secrétaire des services de santé et des services sociaux.

II.2. Les alternatives au tissu fœtal en recherche

Diverses alternatives au tissu fœtal dans la recherche biomédicale sont actuellement en cours de développement et pourraient ainsi remplacer un jour le tissu fœtal. En décembre 2018, le NIH a annoncé un financement pouvant atteindre 20 millions de dollars sur deux ans pour la recherche sur les solutions de remplacement des tissus fœtaux.

C'est ainsi que s'inscrit l'intérêt du projet de cette thèse qui est de développer un modèle similaire à la BLT sans l'utilisation de tissus fœtal. Outre les problèmes importants de logistique liés à la prise à charge et à l'exploitation de ce tissu précieux, il se peut donc aussi que son utilisation devienne extrêmement restreinte, empêchant ainsi la production de ce modèle murin innovant. Le thymus de chirurgie cardiaque n'est quant à lui peu sujet à des problèmes d'éthiques puisqu'il est considéré comme un déchet de chirurgie. En effet, comme il est retiré lors des chirurgies cardiaques de l'enfant, il s'agit alors simplement de mettre en place un consentement éclairé qui permet aux tuteurs de l'enfant de faire don de cet organe à la recherche. Le développement d'alternative pour remplacer la BLT est donc très utile, non seulement aux Etats-Unis où son accès risque d'être limité, mais aussi dans d'autres continents où le tissu fœtal n'est aujourd'hui encore pas accessible pour les chercheurs souhaitant réaliser ce modèle.

Notre modèle utilise des HSC issues de sang de cordon. Or, suite à l'annonce du Président Donald Trump, le NIH a déclaré que les chercheurs devront également expliquer l'utilisation de cellules et tissus extra-embryonnaires humains, tels que tissu de cordon ombilical, sang de cordon, placenta, liquide amniotique et villosités chorioniques, ainsi que celle des produits dérivés de tissus ou de cellules d'avortements spontanés tels que des extraits de protéines ou d'acides nucléiques si les matériaux proviennent d'interruptions volontaires de grossesse. Le développement de modèle alternatif n'en est donc qu'à ses débuts.

Par ailleurs, de nombreux scientifiques et experts médicaux affirment que, dans certains domaines de recherche, aucune alternative au tissu fœtal ne sera suffisante, à l'instar des études sur le développement du fœtus ou des maladies se développant *in utero*.

CHAPITRE 6 - CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Afin d'optimiser le modèle des souris humanisées, les chercheurs aujourd'hui investiguent différentes nouvelles approches, notamment l'amélioration de la reconstitution des cellules humaines, la réduction des rejets de greffes et l'amélioration des réponses humaines aux agents pathogènes pour permettre leur utilisation comme outil de recherche.

Les souris humanisées tels que la BLT présentent plusieurs avantages uniques pour l'étude du VIH ou d'autres pathologies. Premièrement, plusieurs cohortes de souris humanisées peuvent être générées à partir de d'un même donneur. Ceci surmonte les variables intragénétiques générées à partir d'études cliniques sur des données regroupées d'échantillons de patients mais permet également d'analyser les différences génétiques entre deux groupes. Deuxièmement, l'approvisionnement continu en cellules immunisées nouvellement générées au cours de l'infection par des pathogènes permet des études longitudinales sur la persistance et l'évolution du virus. Troisièmement, des isolats de souches pathogènes humaines adaptés au laboratoire peuvent être utilisés chez des souris humanisées pour étudier divers aspects de la maladie tels que dans le cas du VIH sa transmission et la réponse immunitaire humaine associée. Quatrièmement, l'accès à tous les tissus immunitaires, et en particulier aux sites muqueux dans le cas du VIH, permettra un examen approfondi de la biologie du pathogène, qui peut être limité chez l'homme en raison de la difficulté d'obtenir des biopsies de patients infectés. Enfin, de nouvelles approches thérapeutiques ou prophylactiques peuvent être testées chez les souris humanisées en raison de la capacité de ces modèles à récapituler les réponses immunitaires humaines normales.

Nous avons donc montré qu'il est possible de construire un modèle similaire à celui de la BLT en utilisant des HSC de sang de cordon et des thymus issus de chirurgie cardiaque. Ce modèle permet ainsi de remédier à la contrainte d'accès aux tissus fœtaux qui est toujours sujet à de nombreux débats éthiques.

Les modèles de souris humanisées, générés soit avec des tissus humains fœtaux, soit avec des tissus humains non fœtaux, ont considérablement amélioré la capacité d'étude des maladies humaines. Cependant, nombre de ces modèles présentent également de nombreuses

limites, notamment le risque de GvHD et les complications qui en découlent, une durée de vie limitée et une fonction immunitaire humaine incomplète, notamment la réponse humorale.

De plus, dans le modèle CCST, une variabilité de la reconstitution et de la réponse immunitaire a été observée d'une souris à l'autre, mettant en évidence la nécessité de continuer la mise au point de ce modèle. L'amélioration de ce modèle afin de mieux récapituler le système immunitaire humain pourrait donner l'opportunité d'étudier d'autres pathologies et permettre l'évaluation de nouvelles thérapies.

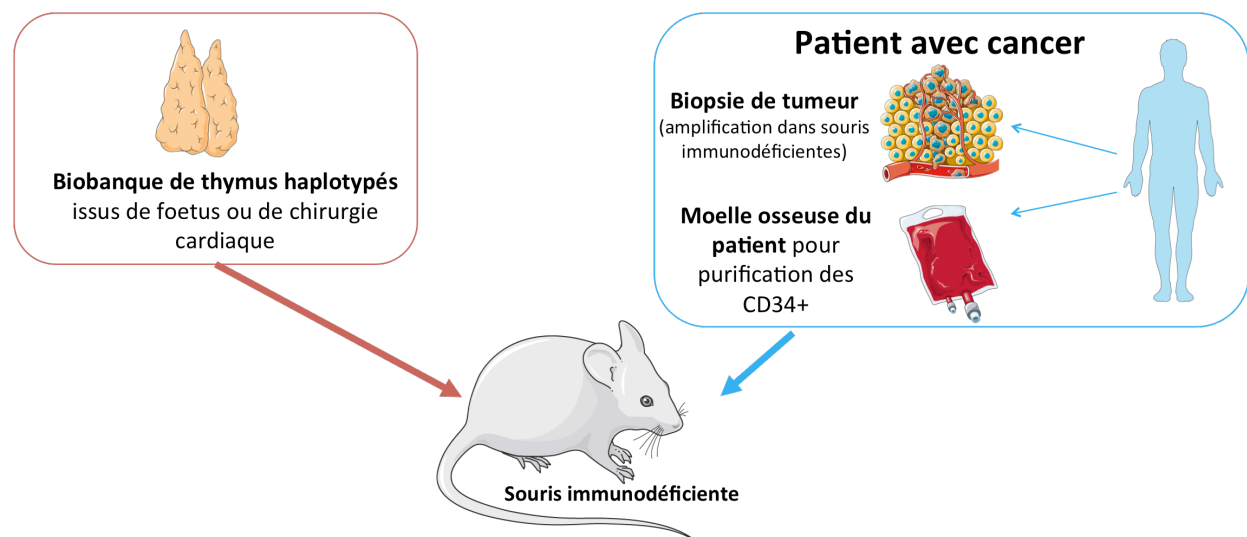


Figure 11. Modèle humanisée PDX avec un système immunitaire autologue

Par exemple, ce modèle innovant ouvre aussi la voie à une nouvelle génération de souris PDX. En effet, de nombreuses études PDX ont déjà été réalisées chez les souris humanisées pour montrer les interactions entre la tumeur et le système immunitaire, mais aucune n'a pas été faite en présence d'un système immunitaire autologue, particulièrement en présence de T fonctionnel produit par le thymus humain. Ainsi les souris CCST permettrait de construire des souris à l'image des patients, pour une médecine personnalisée. Les thymus de chirurgie cardiaque sont cryopréservés et banqués et peuvent être donc haplotypés. En parallèle, il est possible de recevoir de la moelle osseuse de patient atteint de cancer (plusieurs types de cancer peuvent être utilisés ici) ainsi qu'une biopsie de la tumeur. La tumeur, une fois implantée dans une souris

immunodéficiente, a la capacité de s'amplifier⁴³⁸ afin d'être récolté et conservé en grande quantité. Au final, il serait donc possible de construire un modèle de souris greffé avec un thymus de chirurgie cardiaque HLA compatible avec les cellules souches hématopoïétiques du patient qui seront purifiées de la moelle osseuse. Ensuite, après l'obtention d'une reconstitution immunitaire correcte en périphérie, la souris pourra recevoir la tumeur du patient, afin de mimer exactement la maladie du patient dans un modèle de laboratoire (figure 11). Cette nouvelle génération de souris PDX autologue pourrait permettre de mieux comprendre et étudier le fonctionnement des interactions tumeur/système immunitaire, des points de contrôles des inhibiteurs ou des immunorégulateurs ou encore être utile pour le développement d'immunothérapie ou de thérapie cellulaire.

BIBLIOGRAPHIE

1. Isaacson JH & Cattanaach BM. in *Mouse News Letter* (1962).
2. Flanagan, S. P. 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet. Res.* **8**, 295–309 (1966).
3. Pantelouris, E. M. Absence of Thymus in a Mouse Mutant. *Nature* **217**, 370–371 (1968).
4. Rygaard, J. & Povlsen, C. O. Heterotransplantation of a human malignant tumour to 'Nude' mice. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **77**, 758–760 (1969).
5. Bosma, G. C., Custer, R. P. & Bosma, M. J. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* **301**, 527–530 (1983).
6. Bosma, M. J. & Carroll, A. M. The SCID Mouse Mutant: Definition, Characterization, and Potential Uses. *Annu. Rev. Immunol.* **9**, 323–350 (1991).
7. Mosier, D. E., Gulizia, R. J., Baird, S. M. & Wilson, D. B. Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature* **335**, 256–259 (1988).
8. McCune, J. M. *et al.* The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science* **241**, 1632–1639 (1988).
9. Lapidot, T. *et al.* Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice. *Science* **255**, 1137–1141 (1992).
10. Namikawa, R., Kaneshima, H., Lieberman, M., Weissman, I. L. & McCune, J. M. Infection of the SCID-hu mouse by HIV-1. *Science* **242**, 1684–1686 (1988).
11. Vormoor, J. *et al.* High-level multilineage engraftment of human cord blood cells in SCID mice. *J. Hematother.* **2**, 215–216 (1993).
12. Dick, J. E. Normal and leukemic human stem cells assayed in SCID mice. *Semin. Immunol.* **8**, 197–206 (1996).
13. Shultz, L. D. *et al.* Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **154**, 180–191 (1995).
14. Hesselton, R. M. *et al.* High levels of human peripheral blood mononuclear cell engraftment and enhanced susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection in NOD/LtSz-scid/scid mice. *J. Infect. Dis.* **172**, 974–982 (1995).
15. Greiner, D. L., Hesselton, R. A. & Shultz, L. D. SCID mouse models of human stem cell

engraftment. *Stem Cells Dayt. Ohio* **16**, 166–177 (1998).

16. Islas-Ohlmayer, M. *et al.* Experimental Infection of NOD/SCID Mice Reconstituted with Human CD34+ Cells with Epstein-Barr Virus. *J. Virol.* **78**, 13891–13900 (2004).
17. Bente, D. A., Melkus, M. W., Garcia, J. V. & Rico-Hesse, R. Dengue Fever in Humanized NOD/SCID Mice. *J. Virol.* **79**, 13797–13799 (2005).
18. Cravens, P. D. *et al.* Development and activation of human dendritic cells in vivo in a xenograft model of human hematopoiesis. *Stem Cells Dayt. Ohio* **23**, 264–278 (2005).
19. Miyoshi, H., Smith, K. A., Mosier, D. E., Verma, I. M. & Torbett, B. E. Transduction of human CD34+ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. *Science* **283**, 682–686 (1999).
20. Palucka, A. K. *et al.* Human dendritic cell subsets in NOD/SCID mice engrafted with CD34+ hematopoietic progenitors. *Blood* **102**, 3302–3310 (2003).
21. Mombaerts, P. *et al.* RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* **68**, 869–877 (1992).
22. Shinkai, Y. *et al.* RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* **68**, 855–867 (1992).
23. Schatz, D. G., Oettinger, M. A. & Baltimore, D. The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* **59**, 1035–1048 (1989).
24. Oettinger, M. A., Schatz, D. G., Gorka, C. & Baltimore, D. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* **248**, 1517–1523 (1990).
25. Sugamura, K. *et al.* The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 179–205 (1996).
26. Shultz, L. D. *et al.* Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **174**, 6477–6489 (2005).
27. Ito, M. *et al.* NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* **100**, 3175–3182 (2002).
28. Pearson, T. *et al.* Non-obese diabetic-recombination activating gene-1 (NOD-Rag1 null) interleukin (IL)-2 receptor common gamma chain (IL2r gamma null) null mice: a radioresistant model for human lymphohaematopoietic engraftment. *Clin. Exp. Immunol.* **154**, 270–284

(2008).

29. Goldman, J. P. *et al.* Enhanced human cell engraftment in mice deficient in RAG2 and the common cytokine receptor gamma chain. *Br. J. Haematol.* **103**, 335–342 (1998).
30. Cao, X. *et al.* Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain. *Immunity* **2**, 223–238 (1995).
31. DiSanto, J. P., Müller, W., Guy-Grand, D., Fischer, A. & Rajewsky, K. Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 377–381 (1995).
32. Ohbo, K. *et al.* Modulation of hematopoiesis in mice with a truncated mutant of the interleukin-2 receptor gamma chain. *Blood* **87**, 956–967 (1996).
33. Traggiai, E. *et al.* Development of a Human Adaptive Immune System in Cord Blood Cell-Transplanted Mice. *Science* **304**, 104–107 (2004).
34. Ishikawa, F. *et al.* Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor {gamma} chain(null) mice. *Blood* **106**, 1565–1573 (2005).
35. Xia, Z. *et al.* Innate immune response to human bone marrow fibroblastic cell implantation in CB17 scid/beige mice. *J. Cell. Biochem.* **98**, 966–980 (2006).
36. Schneider, M. K., Ekholm, F. & Grönvik, K. O. Severe graft-versus-host disease in SCID mice is associated with a decrease of selective donor cell TCR Vbeta specificities and increased expression of IFN-gamma and IL-4. *Scand. J. Immunol.* **46**, 147–158 (1997).
37. Sheng-Tanner, X., McKerlie, C. & Spaner, D. Characterization of graft-versus-host disease in SCID mice and prevention by physicochemical stressors. *Transplantation* **70**, 1683–1693 (2000).
38. Brehm, M. A., Shultz, L. D., Luban, J. & Greiner, D. L. Overcoming Current Limitations in Humanized Mouse Research. *J. Infect. Dis.* **208**, S125–S130 (2013).
39. Bastide, C., Bagnis, C., Mannoni, P., Hassoun, J. & Bladou, F. A Nod Scid mouse model to study human prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **5**, 311–315 (2002).
40. Ali, N. *et al.* Xenogeneic graft-versus-host-disease in NOD-scid IL-2R γ null mice display a T-effector memory phenotype. *PloS One* **7**, e44219 (2012).
41. Akkina, R. New generation humanized mice for virus research: comparative aspects and future prospects. *Virology* **435**, 14–28 (2013).
42. Watanabe, Y. *et al.* The analysis of the functions of human B and T cells in humanized

- NOD/shi-scid/ cnull (NOG) mice (hu-HSC NOG mice). *Int. Immunol.* **21**, 843–858 (2009).
43. Her, Z. *et al.* An improved pre-clinical patient-derived liquid xenograft mouse model for acute myeloid leukemia. *J. Hematol. Oncol.* **10**, 162 (2017).
 44. Yong, K. S. M. *et al.* Human CD34(lo)CD133(lo) fetal liver cells support the expansion of human CD34(hi)CD133(hi) hematopoietic stem cells. *Cell. Mol. Immunol.* **13**, 605–614 (2016).
 45. Shultz, L. D., Brehm, M. A., Garcia-Martinez, J. V. & Greiner, D. L. Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 786–798 (2012).
 46. Maykel, J. *et al.* NOD-scidIl2rg (tm1Wjl) and NOD-Rag1 (null) Il2rg (tm1Wjl) : a model for stromal cell-tumor cell interaction for human colon cancer. *Dig. Dis. Sci.* **59**, 1169–1179 (2014).
 47. Harris, D. T., Badowski, M., Balamurugan, A. & Yang, O. O. Long-term human immune system reconstitution in non-obese diabetic (NOD)-Rag (-)- γ chain (-) (NRG) mice is similar but not identical to the original stem cell donor. *Clin. Exp. Immunol.* **174**, 402–413 (2013).
 48. Mazurier, F. *et al.* A novel immunodeficient mouse model--RAG2 x common cytokine receptor gamma chain double mutants--requiring exogenous cytokine administration for human hematopoietic stem cell engraftment. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* **19**, 533–541 (1999).
 49. Takenaka, K. *et al.* Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells. *Nat. Immunol.* **8**, 1313–1323 (2007).
 50. Seiffert, M. *et al.* Signal-regulatory protein alpha (SIRPalpha) but not SIRPbeta is involved in T-cell activation, binds to CD47 with high affinity, and is expressed on immature CD34(+)CD38(-) hematopoietic cells. *Blood* **97**, 2741–2749 (2001).
 51. van den Berg, T. K. & van der Schoot, C. E. Innate immune ‘self’ recognition: a role for CD47-SIRPalpha interactions in hematopoietic stem cell transplantation. *Trends Immunol.* **29**, 203–206 (2008).
 52. Strowig, T. *et al.* Transgenic expression of human signal regulatory protein alpha in Rag2-/-gamma(c)-/- mice improves engraftment of human hematopoietic cells in humanized mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 13218–13223 (2011).
 53. Legrand, N. *et al.* Functional CD47/signal regulatory protein alpha (SIRP(alpha))

interaction is required for optimal human T- and natural killer- (NK) cell homeostasis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 13224–13229 (2011).

54. Lavender, K. J. *et al.* BLT-humanized C57BL/6 Rag2^{-/-}γc^{-/-}CD47^{-/-} mice are resistant to GVHD and develop B- and T-cell immunity to HIV infection. *Blood* **122**, 4013–4020 (2013).

55. Lepus, C. M. *et al.* Comparison of human fetal liver, umbilical cord blood, and adult blood hematopoietic stem cell engraftment in NOD-scid/γmac^{-/-}, Balb/c-Rag1^{-/-}γmac^{-/-}, and C.B-17-scid/bg immunodeficient mice. *Hum. Immunol.* **70**, 790–802 (2009).

56. Akkina, R. *et al.* Improvements and Limitations of Humanized Mouse Models for HIV Research: NIH/NIAID ‘Meet the Experts’ 2015 Workshop Summary. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **32**, 109–119 (2016).

57. Brehm, M. A., Bortell, R., Verma, M., Shultz, L. D. & Greiner, D. L. Chapter 11 - Humanized Mice in Translational Immunology. in *Translational Immunology* (ed. Tan, S.-L.) 285–326 (Academic Press, 2016). doi:10.1016/B978-0-12-801577-3.00012-5.

58. Brehm, M. A. *et al.* Engraftment of human HSCs in nonirradiated newborn NOD-scid IL2ry null mice is enhanced by transgenic expression of membrane-bound human SCF. *Blood* **119**, 2778–2788 (2012).

59. Bueno, C., Montes, R., de la Cueva, T., Gutierrez-Aranda, I. & Menendez, P. Intra-bone marrow transplantation of human CD34(+) cells into NOD/LtSz-scid IL-2rgamma(null) mice permits multilineage engraftment without previous irradiation. *Cytotherapy* **12**, 45–49 (2010).

60. Waskow, C. *et al.* Hematopoietic stem cell transplantation without irradiation. *Nat. Methods* **6**, 267–269 (2009).

61. Cosgun, K. N. *et al.* Kit regulates HSC engraftment across the human-mouse species barrier. *Cell Stem Cell* **15**, 227–238 (2014).

62. Pearson, T., Greiner, D. L. & Shultz, L. D. Creation of ‘humanized’ mice to study human immunity. *Curr. Protoc. Immunol.* **Chapter 15**, Unit 15.21 (2008).

63. Brehm, M. A., Wiles, M. V., Greiner, D. L. & Shultz, L. D. Generation of improved humanized mouse models for human infectious diseases. *J. Immunol. Methods* **410**, 3–17 (2014).

64. Ito, R. *et al.* Highly sensitive model for xenogenic GVHD using severe immunodeficient NOG mice. *Transplantation* **87**, 1654–1658 (2009).

65. King, M. A. *et al.* Human peripheral blood leucocyte non-obese diabetic-severe

- combined immunodeficiency interleukin-2 receptor gamma chain gene mouse model of xenogeneic graft-versus-host-like disease and the role of host major histocompatibility complex. *Clin. Exp. Immunol.* **157**, 104–118 (2009).
66. Gregoire-Gauthier, J. *et al.* Therapeutic efficacy of cord blood-derived mesenchymal stromal cells for the prevention of acute graft-versus-host disease in a xenogenic mouse model. *Stem Cells Dev.* **21**, 1616–1626 (2012).
 67. Jang, Y. K. *et al.* Optimization of the therapeutic efficacy of human umbilical cord blood-mesenchymal stromal cells in an NSG mouse xenograft model of graft-versus-host disease. *Cytotherapy* **16**, 298–308 (2014).
 68. Cheung, A. M. S. *et al.* Distinct but phenotypically heterogeneous human cell populations produce rapid recovery of platelets and neutrophils after transplantation. *Blood* **119**, 3431–3439 (2012).
 69. Pham, H.-P. *et al.* Half of the T-cell repertoire combinatorial diversity is genetically determined in humans and humanized mice. *Eur. J. Immunol.* **42**, 760–770 (2012).
 70. Gorantla, S. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 pathobiology studied in humanized BALB/c-Rag2^{-/-}-gammac^{-/-} mice. *J. Virol.* **81**, 2700–2712 (2007).
 71. Yajima, M. *et al.* T cell-mediated control of Epstein-Barr virus infection in humanized mice. *J. Infect. Dis.* **200**, 1611–1615 (2009).
 72. Baenziger, S. *et al.* Disseminated and sustained HIV infection in CD34⁺ cord blood cell-transplanted Rag2^{-/-}-gamma c^{-/-} mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 15951–15956 (2006).
 73. An, D. S. *et al.* Use of a novel chimeric mouse model with a functionally active human immune system to study human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* **14**, 391–396 (2007).
 74. Garcia, S. & Freitas, A. A. Humanized mice: current states and perspectives. *Immunol. Lett.* **146**, 1–7 (2012).
 75. Matsumura, T. *et al.* Functional CD5⁺ B cells develop predominantly in the spleen of NOD/SCID/gammac(null) (NOG) mice transplanted either with human umbilical cord blood, bone marrow, or mobilized peripheral blood CD34⁺ cells. *Exp. Hematol.* **31**, 789–797 (2003).
 76. Miller, J. F. Immunological function of the thymus. *Lancet Lond. Engl.* **2**, 748–749 (1961).
 77. Danner, R. *et al.* Expression of HLA Class II Molecules in Humanized

NOD.Rag1KO.IL2RgcKO Mice Is Critical for Development and Function of Human T and B Cells. *PLoS ONE* **6**, e19826 (2011).

78. Li, W. *et al.* An alternate pathway for CD4 T cell development: thymocyte-expressed MHC class II selects a distinct T cell population. *Immunity* **23**, 375–386 (2005).

79. Lee, J. Y., Han, A.-R. & Lee, D. R. T Lymphocyte Development and Activation in Humanized Mouse Model. *Dev. Reprod.* **23**, 79–92 (2019).

80. Awong, G. & Zúñiga-Pflücker, J. C. Development of Human T Lymphocytes. in *Reference Module in Biomedical Sciences* (Elsevier, 2014). doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.00115-X.

81. Kooreman, N. G. *et al.* Alloimmune Responses of Humanized Mice to Human Pluripotent Stem Cell Therapeutics. *Cell Rep.* **20**, 1978–1990 (2017).

82. Takahama, Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 127–135 (2006).

83. Schwarz, B. A. & Bhandoola, A. Trafficking from the bone marrow to the thymus: a prerequisite for thymopoiesis. *Immunol. Rev.* **209**, 47–57 (2006).

84. Lambolez, F. *et al.* The thymus exports long-lived fully committed T cell precursors that can colonize primary lymphoid organs. *Nat. Immunol.* **7**, 76–82 (2006).

85. Petrie, H. T. & Zúñiga-Pflücker, J. C. Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 649–679 (2007).

86. Punt, J. A., Suzuki, H., Granger, L. G., Sharrow, S. O. & Singer, A. Lineage commitment in the thymus: only the most differentiated (TCRhibcl-2hi) subset of CD4+CD8+ thymocytes has selectively terminated CD4 or CD8 synthesis. *J. Exp. Med.* **184**, 2091–2099 (1996).

87. Carpenter, A. C. & Bosselut, R. Decision checkpoints in the thymus. *Nat. Immunol.* **11**, 666–673 (2010).

88. Fehling, H. J., Krotkova, A., Saint-Ruf, C. & von Boehmer, H. Crucial role of the pre-T-cell receptor alpha gene in development of alpha beta but not gamma delta T cells. *Nature* **375**, 795–798 (1995).

89. Davis, C. B., Killeen, N., Crooks, M. E., Raulet, D. & Littman, D. R. Evidence for a stochastic mechanism in the differentiation of mature subsets of T lymphocytes. *Cell* **73**, 237–247 (1993).

90. Chan, S. H., Cosgrove, D., Waltzinger, C., Benoist, C. & Mathis, D. Another view of the selective model of thymocyte selection. *Cell* **73**, 225–236 (1993).
91. Gascoigne, N. R. J., Rybakin, V., Acuto, O. & Brzostek, J. TCR Signal Strength and T Cell Development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **32**, 327–348 (2016).
92. Lan, P., Tonomura, N., Shimizu, A., Wang, S. & Yang, Y.-G. Reconstitution of a functional human immune system in immunodeficient mice through combined human fetal thymus/liver and CD34⁺ cell transplantation. *Blood* **108**, 487–492 (2006).
93. Tonomura, N., Habiro, K., Shimizu, A., Sykes, M. & Yang, Y.-G. Antigen-specific human T-cell responses and T cell-dependent production of human antibodies in a humanized mouse model. *Blood* **111**, 4293–4296 (2008).
94. Melkus, M. W. *et al.* Humanized mice mount specific adaptive and innate immune responses to EBV and TSST-1. *Nat. Med.* **12**, 1316–1322 (2006).
95. Brainard, D. M. *et al.* Induction of robust cellular and humoral virus-specific adaptive immune responses in human immunodeficiency virus-infected humanized BLT mice. *J. Virol.* **83**, 7305–7321 (2009).
96. Dudek, T. E. *et al.* Rapid evolution of HIV-1 to functional CD8⁺ T cell responses in humanized BLT mice. *Sci. Transl. Med.* **4**, 143ra98 (2012).
97. Biswas, S. *et al.* Humoral immune responses in humanized BLT mice immunized with West Nile virus and HIV-1 envelope proteins are largely mediated via human CD5⁺ B cells. *Immunology* **134**, 419–433 (2011).
98. Vuyyuru, R., Patton, J. & Manser, T. Human immune system mice: current potential and limitations for translational research on human antibody responses. *Immunol. Res.* **51**, 257–266 (2011).
99. Patton, J., Vuyyuru, R., Siglin, A., Root, M. & Manser, T. Evaluation of the efficiency of human immune system reconstitution in NSG mice and NSG mice containing a human HLA.A2 transgene using hematopoietic stem cells purified from different sources. *J. Immunol. Methods* **422**, 13–21 (2015).
100. Covassin, L. *et al.* Human immune system development and survival of non-obese diabetic (NOD)-scid IL2 γ (null) (NSG) mice engrafted with human thymus and autologous haematopoietic stem cells. *Clin. Exp. Immunol.* **174**, 372–388 (2013).
101. Greenblatt, M. B. *et al.* Graft versus host disease in the bone marrow, liver and thymus

humanized mouse model. *PloS One* **7**, e44664 (2012).

102. Lockridge, J. L. *et al.* Mice engrafted with human fetal thymic tissue and hematopoietic stem cells develop pathology resembling chronic graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* **19**, 1310–1322 (2013).

103. Yaguchi, T. *et al.* Human PBMC-transferred murine MHC class I/II-deficient NOG mice enable long-term evaluation of human immune responses. *Cell. Mol. Immunol.* **15**, 953–962 (2018).

104. Brehm, M. A. *et al.* Lack of acute xenogeneic graft- versus-host disease, but retention of T-cell function following engraftment of human peripheral blood mononuclear cells in NSG mice deficient in MHC class I and II expression. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **33**, 3137–3151 (2019).

105. Lavender, K. J., Messer, R. J., Race, B. & Hasenkrug, K. J. Production of bone marrow, liver, thymus (BLT) humanized mice on the C57BL/6 Rag2(-/-)γc(-/-)CD47(-/-) background. *J. Immunol. Methods* **407**, 127–134 (2014).

106. Shultz, L. D. *et al.* Generation of functional human T-cell subsets with HLA-restricted immune responses in HLA class I expressing NOD/SCID/IL2r null humanized mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 13022–13027 (2010).

107. Translational Immunology - 1st Edition. <https://www.elsevier.com/books/translational-immunology/tan/978-0-12-801577-3>.

108. Legrand, N. *et al.* Humanized mice for modeling human infectious disease: challenges, progress, and outlook. *Cell Host Microbe* **6**, 5–9 (2009).

109. Walsh, N. C. *et al.* Humanized Mouse Models of Clinical Disease. *Annu. Rev. Pathol.* **12**, 187–215 (2017).

110. Huang, J., Li, X., Coelho-dos-Reis, J. G. A., Wilson, J. M. & Tsuji, M. An AAV vector-mediated gene delivery approach facilitates reconstitution of functional human CD8⁺ T cells in mice. *PloS One* **9**, e88205 (2014).

111. Sharma, A. *et al.* Respiratory Syncytial Virus (RSV) Pulmonary Infection in Humanized Mice Induces Human Anti-RSV Immune Responses and Pathology. *J. Virol.* **90**, 5068–5074 (2016).

112. Wunderlich, M. *et al.* AML xenograft efficiency is significantly improved in NOD/SCID-IL2RG mice constitutively expressing human SCF, GM-CSF and IL-3. *Leukemia*

24, 1785–1788 (2010).

113. Feuring-Buske, M. *et al.* Improved engraftment of human acute myeloid leukemia progenitor cells in beta 2-microglobulin-deficient NOD/SCID mice and in NOD/SCID mice transgenic for human growth factors. *Leukemia* **17**, 760–763 (2003).

114. Agliano, A. *et al.* Human acute leukemia cells injected in NOD/LtSz-scid/IL-2Rgamma null mice generate a faster and more efficient disease compared to other NOD/scid-related strains. *Int. J. Cancer* **123**, 2222–2227 (2008).

115. Tanaka, S. *et al.* Development of Mature and Functional Human Myeloid Subsets in Hematopoietic Stem Cell-Engrafted NOD/SCID/IL2 γ KO Mice. *J. Immunol.* **188**, 6145–6155 (2012).

116. Ito, R. *et al.* Establishment of a Human Allergy Model Using Human IL-3/GM-CSF–Transgenic NOG Mice. *J. Immunol.* **191**, 2890–2899 (2013).

117. Coughlan, A. M. *et al.* Myeloid Engraftment in Humanized Mice: Impact of Granulocyte-Colony Stimulating Factor Treatment and Transgenic Mouse Strain. *Stem Cells Dev.* **25**, 530–541 (2016).

118. Billerbeck, E. *et al.* Development of human CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T cells in human stem cell factor–, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor–, and interleukin-3–expressing NOD-SCID IL2R γ null humanized mice. *Blood* **117**, 3076–3086 (2011).

119. Bryce, P. J. *et al.* Humanized Mouse Model of Mast Cell-Mediated Passive Cutaneous Anaphylaxis and Passive Systemic Anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **138**, 769–779 (2016).

120. Rongvaux, A. *et al.* Development and function of human innate immune cells in a humanized mouse model. *Nat. Biotechnol.* **32**, 364–372 (2014).

121. Wege, A. K. *et al.* Co-transplantation of human hematopoietic stem cells and human breast cancer cells in NSG mice: a novel approach to generate tumor cell specific human antibodies. *mAbs* **6**, 968–977 (2014).

122. Tsoneva, D. *et al.* Humanized Mice with Subcutaneous Human Solid Tumors for Immune Response Analysis of Vaccinia Virus-Mediated Oncolysis. *Mol. Ther. Oncolytics* **5**, 41–61 (2017).

123. Simpson-Abelson, M. R. *et al.* Long-term engraftment and expansion of tumor-derived memory T cells following the implantation of non-disrupted pieces of human lung tumor into

- NOD-scid IL2Rgamma(null) mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **180**, 7009–7018 (2008).
124. Bankert, R. B. *et al.* Humanized mouse model of ovarian cancer recapitulates patient solid tumor progression, ascites formation, and metastasis. *PloS One* **6**, e24420 (2011).
 125. Cassidy, J. W., Caldas, C. & Bruna, A. Maintaining Tumor Heterogeneity in Patient-Derived Tumor Xenografts. *Cancer Res.* **75**, 2963–2968 (2015).
 126. Pan, C. *et al.* Humanized mice (humice) carrying patient-derived xenograft (PDX) as a platform to develop immunotherapy in bladder cancer (BCa). *J. Clin. Oncol.* **35**, 381–381 (2017).
 127. Roth, M. D. & Harui, A. Human tumor infiltrating lymphocytes cooperatively regulate prostate tumor growth in a humanized mouse model. *J. Immunother. Cancer* **3**, 12 (2015).
 128. Sato, K. *et al.* A novel animal model of Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in humanized mice. *Blood* **117**, 5663–5673 (2011).
 129. Cocco, M. *et al.* CD34+ cord blood cell-transplanted Rag2^{-/-} gamma(c)^{-/-} mice as a model for Epstein-Barr virus infection. *Am. J. Pathol.* **173**, 1369–1378 (2008).
 130. Strowig, T. *et al.* Priming of protective T cell responses against virus-induced tumors in mice with human immune system components. *J. Exp. Med.* **206**, 1423–1434 (2009).
 131. Fujiwara, S., Imadome, K.-I. & Takei, M. Modeling EBV infection and pathogenesis in new-generation humanized mice. *Exp. Mol. Med.* **47**, e135 (2015).
 132. Bradfute, S. B., Warfield, K. L. & Bray, M. Mouse models for filovirus infections. *Viruses* **4**, 1477–1508 (2012).
 133. Spengler, J. R. *et al.* Ebola Virus Replication and Disease Without Immunopathology in Mice Expressing Transgenes to Support Human Myeloid and Lymphoid Cell Engraftment. *J. Infect. Dis.* **214**, S308–S318 (2016).
 134. Bird, B. H. *et al.* Humanized Mouse Model of Ebola Virus Disease Mimics the Immune Responses in Human Disease. *J. Infect. Dis.* **213**, 703–711 (2016).
 135. Subramanya, S. *et al.* Targeted delivery of small interfering RNA to human dendritic cells to suppress dengue virus infection and associated proinflammatory cytokine production. *J. Virol.* **84**, 2490–2501 (2010).
 136. Mota, J. & Rico-Hesse, R. Humanized mice show clinical signs of dengue fever according to infecting virus genotype. *J. Virol.* **83**, 8638–8645 (2009).
 137. Jaiswal, S. *et al.* Enhanced humoral and HLA-A2-restricted dengue virus-specific T-cell

- responses in humanized BLT NSG mice. *Immunology* **136**, 334–343 (2012).
138. Kuruvilla, J. G., Troyer, R. M., Devi, S. & Akkina, R. Dengue virus infection and immune response in humanized RAG2(-/-)gamma(c)(-/-) (RAG-hu) mice. *Virology* **369**, 143–152 (2007).
 139. Washburn, M. L. *et al.* A humanized mouse model to study hepatitis C virus infection, immune response, and liver disease. *Gastroenterology* **140**, 1334–1344 (2011).
 140. Mercer, D. F. *et al.* Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat. Med.* **7**, 927–933 (2001).
 141. Villaudy, J. *et al.* HTLV-1 propels thymic human T cell development in ‘human immune system’ Rag2^{-/-} gamma c^{-/-} mice. *PLoS Pathog.* **7**, e1002231 (2011).
 142. Smith, M. S. *et al.* Granulocyte-colony stimulating factor reactivates human cytomegalovirus in a latently infected humanized mouse model. *Cell Host Microbe* **8**, 284–291 (2010).
 143. Vuyyuru, R., Liu, H., Manser, T. & Alugupalli, K. R. Characteristics of *Borrelia hermsii* infection in human hematopoietic stem cell-engrafted mice mirror those of human relapsing fever. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 20707–20712 (2011).
 144. Song, J. *et al.* A mouse model for the human pathogen *Salmonella typhi*. *Cell Host Microbe* **8**, 369–376 (2010).
 145. Calderon, V. E. *et al.* A humanized mouse model of tuberculosis. *PloS One* **8**, e63331 (2013).
 146. Gottlieb, M. S. *et al.* *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* **305**, 1425–1431 (1981).
 147. Barré-Sinoussi, F. *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868–871 (1983).
 148. Buonaguro, L., Tornesello, M. L. & Buonaguro, F. M. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype Distribution in the Worldwide Epidemic: Pathogenetic and Therapeutic Implications. *J. Virol.* **81**, 10209–10219 (2007).
 149. Hahn, B. H. *et al.* Molecular cloning and characterization of the HTLV-III virus associated with AIDS. *Nature* **312**, 166–169 (1984).
 150. Freed, E. O. HIV-1 replication. *Somat. Cell Mol. Genet.* **26**, 13–33 (2001).

151. Scarlatti, G. *et al.* In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. *Nat. Med.* **3**, 1259–1265 (1997).
152. Watts, J. M. *et al.* Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. *Nature* **460**, 711–716 (2009).
153. Li, G. & De Clercq, E. HIV Genome-Wide Protein Associations: a Review of 30 Years of Research. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **80**, 679–731 (2016).
154. Dalglish, A. G. *et al.* The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**, 763–767 (1984).
155. Klatzmann, D. *et al.* T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **312**, 767–768 (1984).
156. Moore, J. P., McKeating, J. A., Norton, W. A. & Sattentau, Q. J. Direct measurement of soluble CD4 binding to human immunodeficiency virus type 1 virions: gp120 dissociation and its implications for virus-cell binding and fusion reactions and their neutralization by soluble CD4. *J. Virol.* **65**, 1133–1140 (1991).
157. Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E. & Berger, E. A. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **272**, 872–877 (1996).
158. Sattentau, Q. J. & Moore, J. P. Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding. *J. Exp. Med.* **174**, 407–415 (1991).
159. Brown, P. O. Integration of Retroviral DNA. in *Retroviruses* (eds. Swanstrom, R. & Vogt, P. K.) 19–48 (Springer Berlin Heidelberg, 1990).
160. Bushman, F. D., Fujiwara, T. & Craigie, R. Retroviral DNA integration directed by HIV integration protein in vitro. *Science* **249**, 1555–1558 (1990).
161. Schwartz, S., Felber, B. K., Fenyő, E. M. & Pavlakis, G. N. Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *J. Virol.* **64**, 5448–5456 (1990).
162. Schwartz, S., Felber, B. K., Benko, D. M., Fenyő, E. M. & Pavlakis, G. N. Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **64**, 2519–2529 (1990).
163. Robert-Guroff, M. *et al.* Structure and expression of tat-, rev-, and nef-specific

- transcripts of human immunodeficiency virus type 1 in infected lymphocytes and macrophages. *J. Virol.* **64**, 3391–3398 (1990).
164. Nishino, Y. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 vif, vpr, and vpu mutants can produce persistently infected cells. *Arch. Virol.* **120**, 181–192 (1991).
 165. Hallenberger, S. *et al.* Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* **360**, 358–361 (1992).
 166. Pancera, M. *et al.* Structure of HIV-1 gp120 with gp41-interactive region reveals layered envelope architecture and basis of conformational mobility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 1166–1171 (2010).
 167. Freed, E. O. & Martin, M. A. The role of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins in virus infection. *J. Biol. Chem.* **270**, 23883–23886 (1995).
 168. Sundquist, W. I. & Kräusslich, H.-G. HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, (2012).
 169. Laguette, N. *et al.* SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* **474**, 654–657 (2011).
 170. Sheehy, A. M., Gaddis, N. C., Choi, J. D. & Malim, M. H. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* **418**, 646–650 (2002).
 171. Neil, S. J. D., Zang, T. & Bieniasz, P. D. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* **451**, 425–430 (2008).
 172. Sewram, S. *et al.* Human TRIM5alpha expression levels and reduced susceptibility to HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.* **199**, 1657–1663 (2009).
 173. Salazar-Gonzalez, J. F. *et al.* Genetic identity, biological phenotype, and evolutionary pathways of transmitted/founder viruses in acute and early HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* **206**, 1273–1289 (2009).
 174. Keele, B. F. *et al.* Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 7552–7557 (2008).
 175. Haase, A. T. Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission. *Nature* **464**, 217–223 (2010).
 176. McMichael, A. J., Borrow, P., Tomaras, G. D., Goonetilleke, N. & Haynes, B. F. The

- immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 11–23 (2010).
177. Mellors, J. W. *et al.* Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion. *Ann. Intern. Med.* **122**, 573–579 (1995).
 178. Piatak, M. *et al.* High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* **259**, 1749–1754 (1993).
 179. Pantaleo, G. *et al.* HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* **362**, 355–358 (1993).
 180. Mehandru, S. *et al.* Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4⁺ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.* **200**, 761–770 (2004).
 181. Vangipuram, R. & Tying, S. K. AIDS-Associated Malignancies. *Cancer Treat. Res.* **177**, 1–21 (2019).
 182. Gilbert, P. B. *et al.* Statistical interpretation of the RV144 HIV vaccine efficacy trial in Thailand: a case study for statistical issues in efficacy trials. *J. Infect. Dis.* **203**, 969–975 (2011).
 183. Rerks-Ngarm, S. *et al.* Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N. Engl. J. Med.* **361**, 2209–2220 (2009).
 184. Contento, R. L. *et al.* CXCR4-CCR5: a couple modulating T cell functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 10101–10106 (2008).
 185. Corbeau, P. & Reynes, J. CCR5 antagonism in HIV infection: ways, effects, and side effects. *AIDS Lond. Engl.* **23**, 1931–1943 (2009).
 186. Gonzalez, E. *et al.* The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science* **307**, 1434–1440 (2005).
 187. Vetter, M. L. & D'Aquila, R. T. Cytoplasmic APOBEC3G Restricts Incoming Vif-Positive Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Increases Two-Long Terminal Repeat Circle Formation in Activated T-Helper-Subtype Cells. *J. Virol.* **83**, 8646–8654 (2009).
 188. Laguette, N. *et al.* SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* **474**, 654–657 (2011).
 189. Kaslow, R. A. *et al.* Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat. Med.* **2**, 405–411 (1996).
 190. Liu, R. *et al.* Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some

- multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* **86**, 367–377 (1996).
191. Huang, Y. *et al.* The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat. Med.* **2**, 1240–1243 (1996).
 192. Kirchhoff, F., Greenough, T. C., Brettler, D. B., Sullivan, J. L. & Desrosiers, R. C. Absence of Intact nef Sequences in a Long-Term Survivor with Nonprogressive HIV-1 Infection. *N. Engl. J. Med.* **332**, 228–232 (1995).
 193. Lefrère, J. J. *et al.* Even individuals considered as long-term nonprogressors show biological signs of progression after 10 years of human immunodeficiency virus infection. *Blood* **90**, 1133–1140 (1997).
 194. Lambotte, O. *et al.* HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control of viral replication. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **41**, 1053–1056 (2005).
 195. Study, T. I. H. C. The Major Genetic Determinants of HIV-1 Control Affect HLA Class I Peptide Presentation. *Science* **330**, 1551–1557 (2010).
 196. Rohowsky-Kochan, C., Skurnick, J., Molinaro, D. & Louria, D. HLA antigens associated with susceptibility/resistance to HIV-1 infection. *Hum. Immunol.* **59**, 802–815 (1998).
 197. MacDonald, K. S. *et al.* Influence of HLA Supertypes on Susceptibility and Resistance to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J. Infect. Dis.* **181**, 1581–1589 (2000).
 198. Mellors, J. W. *et al.* Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* **272**, 1167–1170 (1996).
 199. Oxenius, A. *et al.* Early highly active antiretroviral therapy for acute HIV-1 infection preserves immune function of CD8+ and CD4+ T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 3382–3387 (2000).
 200. Alter, G. *et al.* Increased Natural Killer Cell Activity in Viremic HIV-1 Infection. *J. Immunol.* **173**, 5305–5311 (2004).
 201. Mavilio, D. *et al.* Natural killer cells in HIV-1 infection: Dichotomous effects of viremia on inhibitory and activating receptors and their functional correlates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 15011–15016 (2003).
 202. Cooper, M. A., Fehniger, T. A. & Caligiuri, M. A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* **22**, 633–640 (2001).
 203. Fauci, A. S., Mavilio, D. & Kottlil, S. NK cells in HIV infection: paradigm for

- protection or targets for ambush. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 835–843 (2005).
204. Martin, M. P. *et al.* Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nat. Genet.* **39**, 733–740 (2007).
205. Plotkin, S. A. Correlates of Protection Induced by Vaccination. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* **17**, 1055–1065 (2010).
206. Pegu, A., Hessel, A. J., Mascola, J. R. & Haigwood, N. L. Use of broadly neutralizing antibodies for HIV-1 prevention. *Immunol. Rev.* **275**, 296–312 (2017).
207. Kwong, P. D., Mascola, J. R. & Nabel, G. J. Broadly neutralizing antibodies and the search for an HIV-1 vaccine: the end of the beginning. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 693–701 (2013).
208. Halper-Stromberg, A. & Nussenzweig, M. C. Towards HIV-1 remission: potential roles for broadly neutralizing antibodies. *J. Clin. Invest.* **126**, 415–423 (2016).
209. Caskey, M. *et al.* Viraemia suppressed in HIV-1-infected humans by broadly neutralizing antibody 3BNC117. *Nature* **522**, 487–491 (2015).
210. Caskey, M. *et al.* Antibody 10-1074 suppresses viremia in HIV-1-infected individuals. *Nat. Med.* **23**, 185–191 (2017).
211. Bar, K. J. *et al.* Effect of HIV Antibody VRC01 on Viral Rebound after Treatment Interruption. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1608243>
<https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1608243> (2016) doi:10.1056/NEJMoa1608243.
212. Halper-Stromberg, A. *et al.* Broadly neutralizing antibodies and viral inducers decrease rebound from HIV-1 latent reservoirs in humanized mice. *Cell* **158**, 989–999 (2014).
213. Hessel, A. J. *et al.* Early short-term treatment with neutralizing human monoclonal antibodies halts SHIV infection in infant macaques. *Nat. Med.* **22**, 362–368 (2016).
214. Barouch, D. H. *et al.* Therapeutic efficacy of potent neutralizing HIV-1-specific monoclonal antibodies in SHIV-infected rhesus monkeys. *Nature* **503**, 224–228 (2013).
215. Schoofs, T. *et al.* HIV-1 therapy with monoclonal antibody 3BNC117 elicits host immune responses against HIV-1. *Science* **352**, 997–1001 (2016).
216. Lynch, R. M. *et al.* Virologic effects of broadly neutralizing antibody VRC01 administration during chronic HIV-1 infection. *Sci. Transl. Med.* **7**, 319ra206 (2015).
217. Bournazos, S., Klein, F., Seaman, M. S., Nussenzweig, M. C. & Ravetch, J. V. Broadly neutralizing anti-HIV-1 antibodies require Fc effector functions for in vivo activity. *Cell* **158**, 1243–1253 (2014).

218. Shingai, M. *et al.* Antibody-mediated immunotherapy of macaques chronically infected with SHIV suppresses viraemia. *Nature* **503**, 277–280 (2013).
219. Bolton, D. L. *et al.* Human Immunodeficiency Virus Type 1 Monoclonal Antibodies Suppress Acute Simian-Human Immunodeficiency Virus Viremia and Limit Seeding of Cell-Associated Viral Reservoirs. *J. Virol.* **90**, 1321–1332 (2016).
220. Derdeyn, C. A., Moore, P. L. & Morris, L. Development of broadly neutralizing antibodies from autologous neutralizing antibody responses in HIV infection. *Curr. Opin. HIV AIDS* **9**, 210–216 (2014).
221. Walker, L. M. *et al.* Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science* **326**, 285–289 (2009).
222. Wu, X. *et al.* Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1. *Science* **329**, 856–861 (2010).
223. Zhou, T. *et al.* Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01. *Science* **329**, 811–817 (2010).
224. Barouch, D. H. *et al.* Protective efficacy of a global HIV-1 mosaic vaccine against heterologous SHIV challenges in rhesus monkeys. *Cell* **155**, 531–539 (2013).
225. Parsons, M. S. *et al.* Partial efficacy of a broadly neutralizing antibody against cell-associated SHIV infection. *Sci. Transl. Med.* **9**, (2017).
226. Baba, T. W. *et al.* Human neutralizing monoclonal antibodies of the IgG1 subtype protect against mucosal simian-human immunodeficiency virus infection. *Nat. Med.* **6**, 200–206 (2000).
227. Peeters, M. *et al.* Isolation and partial characterization of an HIV-related virus occurring naturally in chimpanzees in Gabon. *AIDS Lond. Engl.* **3**, 625–630 (1989).
228. Rock, K. L., Gamble, S. & Rothstein, L. Presentation of exogenous antigen with class I major histocompatibility complex molecules. *Science* **249**, 918–921 (1990).
229. Cruz, F. M., Colbert, J. D., Merino, E., Kriegsman, B. A. & Rock, K. L. The Biology and Underlying Mechanisms of Cross-Presentation of Exogenous Antigens on MHC-I Molecules. *Annu. Rev. Immunol.* **35**, 149–176 (2017).
230. Hancock, G. *et al.* Identification of Effective Subdominant Anti-HIV-1 CD8+ T Cells Within Entire Post-infection and Post-vaccination Immune Responses. *PLOS Pathog.* **11**, e1004658 (2015).

231. Horton, H. *et al.* Preservation of T Cell Proliferation Restricted by Protective HLA Alleles Is Critical for Immune Control of HIV-1 Infection. *J. Immunol.* **177**, 7406–7415 (2006).
232. Betts, M. R. *et al.* HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8⁺ T cells. *Blood* **107**, 4781–4789 (2006).
233. Koup, R. A. *et al.* Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J. Virol.* **68**, 4650–4655 (1994).
234. Ogg, G. S. *et al.* Longitudinal phenotypic analysis of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes: correlation with disease progression. *J. Virol.* **73**, 9153–9160 (1999).
235. Borrow, P., Lewicki, H., Hahn, B. H., Shaw, G. M. & Oldstone, M. B. Virus-specific CD8⁺ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* **68**, 6103–6110 (1994).
236. Yu, X. G. *et al.* Consistent Patterns in the Development and Immunodominance of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)-Specific CD8⁺ T-Cell Responses following Acute HIV-1 Infection. *J. Virol.* **76**, 8690–8701 (2002).
237. Jin, X. *et al.* Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J. Exp. Med.* **189**, 991–998 (1999).
238. Schmitz, J. E. *et al.* Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8⁺ lymphocytes. *Science* **283**, 857–860 (1999).
239. Boaz, M. J., Waters, A., Murad, S., Easterbrook, P. J. & Vyakarnam, A. Presence of HIV-1 Gag-specific IFN-gamma+IL-2⁺ and CD28+IL-2⁺ CD4 T cell responses is associated with nonprogression in HIV-1 infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **169**, 6376–6385 (2002).
240. Almeida, J. R. *et al.* Superior control of HIV-1 replication by CD8⁺ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. *J. Exp. Med.* **204**, 2473–2485 (2007).
241. Migueles, S. A. *et al.* HIV-specific CD8⁺ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nat. Immunol.* **3**, 1061–1068 (2002).
242. Sáez-Cirión, A. *et al.* HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 6776–6781 (2007).
243. Chen, H. *et al.* Differential neutralization of human immunodeficiency virus (HIV)

- replication in autologous CD4 T cells by HIV-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Virol.* **83**, 3138–3149 (2009).
244. Migueles, S. A. *et al.* Lytic granule loading of CD8⁺ T cells is required for HIV-infected cell elimination associated with immune control. *Immunity* **29**, 1009–1021 (2008).
245. Goonetilleke, N. *et al.* The first T cell response to transmitted/founder virus contributes to the control of acute viremia in HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* **206**, 1253–1272 (2009).
246. Edwards, B. H. *et al.* Magnitude of functional CD8⁺ T-cell responses to the gag protein of human immunodeficiency virus type 1 correlates inversely with viral load in plasma. *J. Virol.* **76**, 2298–2305 (2002).
247. Kiepiela, P. *et al.* CD8⁺ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nat. Med.* **13**, 46–53 (2007).
248. Goulder, P. J. *et al.* Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat. Med.* **3**, 212–217 (1997).
249. Schneidewind, A. *et al.* Structural and Functional Constraints Limit Options for Cytotoxic T-Lymphocyte Escape in the Immunodominant HLA-B27-Restricted Epitope in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Capsid. *J. Virol.* **82**, 5594–5605 (2008).
250. Schneidewind, A. *et al.* Transmission and Long-Term Stability of Compensated CD8 Escape Mutations. *J. Virol.* **83**, 3993–3997 (2009).
251. Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. & Coffman, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **136**, 2348–2357 (1986).
252. Simon, M. M., Landolfo, S., Diamantstein, T. & Hochgeschwender, U. Antigen- and lectin-sensitized murine cytolytic T lymphocyte-precursors require both interleukin 2 and endogenously produced immune (gamma) interferon for their growth and differentiation into effector cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **126**, 173–185 (1986).
253. Shedlock, D. J. & Shen, H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* **300**, 337–339 (2003).
254. Sun, J. C. & Bevan, M. J. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* **300**, 339–342 (2003).
255. Lebman, D. A. & Coffman, R. L. Interleukin 4 causes isotype switching to IgE in T cell-stimulated clonal B cell cultures. *J. Exp. Med.* **168**, 853–862 (1988).

256. Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M. & Stockinger, B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* **24**, 179–189 (2006).
257. Levy, J. A. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol. Rev.* **57**, 183–289 (1993).
258. Brenchley, J. M. *et al.* CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.* **200**, 749–759 (2004).
259. Klatt, N. R. & Brenchley, J. M. Th17 Cell Dynamics in HIV Infection. *Curr. Opin. HIV AIDS* **5**, 135–140 (2010).
260. Christensen-Quick, A. *et al.* Human Th17 Cells Lack HIV-Inhibitory RNases and Are Highly Permissive to Productive HIV Infection. *J. Virol.* **90**, 7833–7847 (2016).
261. Heredia, A. *et al.* Targeting of mTOR catalytic site inhibits multiple steps of the HIV-1 lifecycle and suppresses HIV-1 viremia in humanized mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 9412–9417 (2015).
262. Planas, D. *et al.* HIV-1 selectively targets gut-homing CCR6+CD4+ T cells via mTOR-dependent mechanisms. *JCI Insight* **2**, (2017).
263. Bernier, A. *et al.* Transcriptional profiling reveals molecular signatures associated with HIV permissiveness in Th1Th17 cells and identifies peroxisome proliferator-activated receptor gamma as an intrinsic negative regulator of viral replication. *Retrovirology* **10**, 160 (2013).
264. McCune, J. M. The dynamics of CD4 + T-cell depletion in HIV disease. *Nature* **410**, 974–979 (2001).
265. Douek, D. C. *et al.* HIV preferentially infects HIV-specific CD4 + T cells. *Nature* **417**, 95–98 (2002).
266. Chomont, N. *et al.* HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat. Med.* **15**, 893–900 (2009).
267. Khanna, R. *et al.* Class I processing-defective Burkitt's lymphoma cells are recognized efficiently by CD4+ EBV-specific CTLs. *J. Immunol.* **158**, 3619–3625 (1997).
268. Long, H. M. *et al.* CD4+ T-Cell Responses to Epstein-Barr Virus (EBV) Latent-Cycle Antigens and the Recognition of EBV-Transformed Lymphoblastoid Cell Lines. *J. Virol.* **79**, 4896–4907 (2005).
269. Soghoian, D. Z. & Streeck, H. Cytolytic CD4(+) T cells in viral immunity. *Expert Rev.*

Vaccines **9**, 1453–1463 (2010).

270. Debbabi, H. *et al.* Primary type II alveolar epithelial cells present microbial antigens to antigen-specific CD4⁺ T cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **289**, L274–279 (2005).

271. Brien, J. D., Uhrlaub, J. L. & Nikolich-Zugich, J. West Nile virus-specific CD4 T cells exhibit direct antiviral cytokine secretion and cytotoxicity and are sufficient for antiviral protection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **181**, 8568–8575 (2008).

272. Sparks-Thissen, R. L., Braaten, D. C., Kreher, S., Speck, S. H. & Virgin, H. W. An optimized CD4 T-cell response can control productive and latent gammaherpesvirus infection. *J. Virol.* **78**, 6827–6835 (2004).

273. Stuller, K. A., Cush, S. S. & Flaño, E. Persistent gamma-herpesvirus infection induces a CD4 T cell response containing functionally distinct effector populations. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **184**, 3850–3856 (2010).

274. Münz, C. *et al.* Human CD4(+) T lymphocytes consistently respond to the latent Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA1. *J. Exp. Med.* **191**, 1649–1660 (2000).

275. Soghoian, D. Z. *et al.* HIV-specific cytolytic CD4 T cell responses during acute HIV infection predict disease outcome. *Sci. Transl. Med.* **4**, 123ra25 (2012).

276. Swiecki, M. & Colonna, M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 471–485 (2015).

277. Beignon, A.-S. *et al.* Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J. Clin. Invest.* **115**, 3265–3275 (2005).

278. Pritschet, K. *et al.* CD4- and dynamin-dependent endocytosis of HIV-1 into plasmacytoid dendritic cells. *Virology* **423**, 152–164 (2012).

279. Bloch, N. *et al.* HIV type 1 infection of plasmacytoid and myeloid dendritic cells is restricted by high levels of SAMHD1 and cannot be counteracted by Vpx. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **30**, 195–203 (2014).

280. Lepelley, A. *et al.* Innate sensing of HIV-infected cells. *PLoS Pathog.* **7**, e1001284 (2011).

281. Bego, M. G. *et al.* Vpu Exploits the Cross-Talk between BST2 and the ILT7 Receptor to Suppress Anti-HIV-1 Responses by Plasmacytoid Dendritic Cells. *PLoS Pathog.* **11**, e1005024 (2015).

282. Li, Q. *et al.* Glycerol monolaurate prevents mucosal SIV transmission. *Nature* **458**,

1034–1038 (2009).

283. Lehmann, C. *et al.* Longitudinal analysis of distribution and function of plasmacytoid dendritic cells in peripheral blood and gut mucosa of HIV infected patients. *J. Infect. Dis.* **209**, 940–949 (2014).

284. Reeves, R. K. *et al.* SIV infection induces accumulation of plasmacytoid dendritic cells in the gut mucosa. *J. Infect. Dis.* **206**, 1462–1468 (2012).

285. Lehmann, C. *et al.* Plasmacytoid Dendritic Cells Accumulate and Secrete Interferon Alpha in Lymph Nodes of HIV-1 Patients. *PLOS ONE* **5**, e11110 (2010).

286. Brown, K. N., Wijewardana, V., Liu, X. & Barratt-Boyes, S. M. Rapid influx and death of plasmacytoid dendritic cells in lymph nodes mediate depletion in acute simian immunodeficiency virus infection. *PLoS Pathog.* **5**, e1000413 (2009).

287. O'Brien, M. *et al.* Spatiotemporal trafficking of HIV in human plasmacytoid dendritic cells defines a persistently IFN- α -producing and partially matured phenotype. *J. Clin. Invest.* **121**, 1088–1101 (2011).

288. Doyle, T., Goujon, C. & Malim, M. H. HIV-1 and interferons: who's interfering with whom? *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 403–413 (2015).

289. Cameron, P. U. *et al.* Dendritic cells exposed to human immunodeficiency virus type-1 transmit a vigorous cytopathic infection to CD4⁺ T cells. *Science* **257**, 383–387 (1992).

290. Derby, N., Martinelli, E. & Robbiani, M. Myeloid dendritic cells in HIV-1 infection. *Curr. Opin. HIV AIDS* **6**, 379–384 (2011).

291. Huber, A., Dammeijer, F., Aerts, J. G. J. V. & Vroman, H. Current State of Dendritic Cell-Based Immunotherapy: Opportunities for in vitro Antigen Loading of Different DC Subsets? *Front. Immunol.* **9**, 2804 (2018).

292. Martín-Moreno, A. & Muñoz-Fernández, M. A. Dendritic Cells, the Double Agent in the War Against HIV-1. *Front. Immunol.* **10**, (2019).

293. Drucker, J. L. & King, D. H. Management of viral infections in AIDS patients. *Infection* **15 Suppl 1**, S32–33 (1987).

294. Holec, A. D., Mandal, S., Prathipati, P. K. & Destache, C. J. Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors: A Thorough Review, Present Status and Future Perspective as HIV Therapeutics. *Curr. HIV Res.* **15**, 411–421 (2017).

295. Cihlar, T. & Ray, A. S. Nucleoside and nucleotide HIV reverse transcriptase inhibitors:

- 25 years after zidovudine. *Antiviral Res.* **85**, 39–58 (2010).
296. Maga, G., Radi, M., Gerard, M.-A., Botta, M. & Ennifar, E. HIV-1 RT Inhibitors with a Novel Mechanism of Action: NNRTIs that Compete with the Nucleotide Substrate. *Viruses* **2**, 880–899 (2010).
297. Clavel, F. & Hance, A. J. HIV drug resistance. *N. Engl. J. Med.* **350**, 1023–1035 (2004).
298. Sluis-Cremer, N. The Emerging Profile of Cross-Resistance among the Nonnucleoside HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors. *Viruses* **6**, 2960–2973 (2014).
299. Lv, Z., Chu, Y. & Wang, Y. HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity. *HIV/AIDS Auckl. NZ* **7**, 95–104 (2015).
300. Ghosh, A. K., Osswald, H. L. & Prato, G. Recent Progress in the Development of HIV-1 Protease Inhibitors for the Treatment of HIV/AIDS. *J. Med. Chem.* **59**, 5172–5208 (2016).
301. Flexner, C. HIV-protease inhibitors. *N. Engl. J. Med.* **338**, 1281–1292 (1998).
302. Castain, L. *et al.* New mechanisms of resistance in virological failure to protease inhibitors: selection of non-described protease, Gag and Gp41 mutations. *J. Antimicrob. Chemother.* **74**, 2019–2023 (2019).
303. Wensing, A. M. *et al.* 2017 Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1. *Top. Antivir. Med.* **24**, 132–133 (2016).
304. Hazuda, D. J. *et al.* Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. *Science* **287**, 646–650 (2000).
305. Steigbigel, R. T. *et al.* Raltegravir with optimized background therapy for resistant HIV-1 infection. *N. Engl. J. Med.* **359**, 339–354 (2008).
306. Summa, V. *et al.* Discovery of raltegravir, a potent, selective orally bioavailable HIV-integrase inhibitor for the treatment of HIV-AIDS infection. *J. Med. Chem.* **51**, 5843–5855 (2008).
307. Croxtall, J. D. & Keam, S. J. Raltegravir: a review of its use in the management of HIV infection in treatment-experienced patients. *Drugs* **69**, 1059–1075 (2009).
308. Hightower, K. E. *et al.* Dolutegravir (S/GSK1349572) exhibits significantly slower dissociation than raltegravir and elvitegravir from wild-type and integrase inhibitor-resistant HIV-1 integrase-DNA complexes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 4552–4559 (2011).
309. Qian, K., Morris-Natschke, S. L. & Lee, K.-H. HIV Entry Inhibitors and Their Potential in HIV Therapy. *Med. Res. Rev.* **29**, 369–393 (2009).

310. Eggink, D., Berkhout, B. & Sanders, R. W. Inhibition of HIV-1 by fusion inhibitors. *Curr. Pharm. Des.* **16**, 3716–3728 (2010).
311. Woollard, S. M. & Kanmogne, G. D. Maraviroc: a review of its use in HIV infection and beyond. *Drug Des. Devel. Ther.* **9**, 5447–5468 (2015).
312. Miller, M. D. & Hazuda, D. J. HIV resistance to the fusion inhibitor enfuvirtide: mechanisms and clinical implications. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* **7**, 89–95 (2004).
313. Greenberg, M. L. & Cammack, N. Resistance to enfuvirtide, the first HIV fusion inhibitor. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**, 333–340 (2004).
314. Maenza, J. & Flexner, C. Combination antiretroviral therapy for HIV infection. *Am. Fam. Physician* **57**, 2789–2798 (1998).
315. Lok, J. J. *et al.* Long-term increase in CD4+ T-cell counts during combination antiretroviral therapy for HIV-1 infection. *AIDS Lond. Engl.* **24**, 1867–1876 (2010).
316. Rehr, M. *et al.* Emergence of polyfunctional CD8+ T cells after prolonged suppression of human immunodeficiency virus replication by antiretroviral therapy. *J. Virol.* **82**, 3391–3404 (2008).
317. Guihot, A., Bourgarit, A., Carcelain, G. & Autran, B. Immune reconstitution after a decade of combined antiretroviral therapies for human immunodeficiency virus. *Trends Immunol.* **32**, 131–137 (2011).
318. Guihot, A. *et al.* Immune and virological benefits of 10 years of permanent viral control with antiretroviral therapy. *AIDS Lond. Engl.* **24**, 614–617 (2010).
319. Mocroft, A. *et al.* The incidence of AIDS-defining illnesses at a current CD4 count ≥ 200 cells/ μ L in the post-combination antiretroviral therapy era. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **57**, 1038–1047 (2013).
320. Hleyhel, M. *et al.* Risk of AIDS-defining cancers among HIV-1-infected patients in France between 1992 and 2009: results from the FHDH-ANRS CO4 cohort. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **57**, 1638–1647 (2013).
321. Mocroft, A. *et al.* Decline in the AIDS and death rates in the EuroSIDA study: an observational study. *Lancet Lond. Engl.* **362**, 22–29 (2003).
322. Palella, F. J. *et al.* Survival benefit of initiating antiretroviral therapy in HIV-infected persons in different CD4+ cell strata. *Ann. Intern. Med.* **138**, 620–626 (2003).

323. Rodger, A. J. *et al.* Mortality in well controlled HIV in the continuous antiretroviral therapy arms of the SMART and ESPRIT trials compared with the general population. *AIDS Lond. Engl.* **27**, 973–979 (2013).
324. May, M. T. *et al.* Impact on life expectancy of HIV-1 positive individuals of CD4+ cell count and viral load response to antiretroviral therapy. *AIDS Lond. Engl.* **28**, 1193–1202 (2014).
325. Taiwo, B. *et al.* Antiretroviral drug resistance in HIV-1-infected patients experiencing persistent low-level viremia during first-line therapy. *J. Infect. Dis.* **204**, 515–520 (2011).
326. Vardhanabhuti, S., Taiwo, B., Kuritzkes, D. R., Eron, J. J. & Bosch, R. J. Phylogenetic evidence of HIV-1 sequence evolution in subjects with persistent low-level viraemia. *Antivir. Ther.* **20**, 73–76 (2015).
327. Donnell, D. *et al.* Heterosexual HIV-1 transmission after initiation of antiretroviral therapy: a prospective cohort analysis. *Lancet Lond. Engl.* **375**, 2092–2098 (2010).
328. Cohen, M. S. *et al.* Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. *N. Engl. J. Med.* **365**, 493–505 (2011).
329. Mariani, R. *et al.* A block to human immunodeficiency virus type 1 assembly in murine cells. *J. Virol.* **74**, 3859–3870 (2000).
330. Bieniasz, P. D. & Cullen, B. R. Multiple blocks to human immunodeficiency virus type 1 replication in rodent cells. *J. Virol.* **74**, 9868–9877 (2000).
331. Boberg, A. *et al.* Murine models for HIV vaccination and challenge. *Expert Rev. Vaccines* **7**, 117–130 (2008).
332. Denton, P. W. & Garcia, J. V. Novel humanized murine models for HIV research. *Curr. HIV/AIDS Rep.* **6**, 13–19 (2009).
333. Berges, B. K., Akkina, S. R., Remling, L. & Akkina, R. Humanized Rag2(-/-)gammac(-/-) (RAG-hu) mice can sustain long-term chronic HIV-1 infection lasting more than a year. *Virology* **397**, 100–103 (2010).
334. Berges, B. K., Wheat, W. H., Palmer, B. E., Connick, E. & Akkina, R. HIV-1 infection and CD4 T cell depletion in the humanized Rag2-/-gamma c-/- (RAG-hu) mouse model. *Retrovirology* **3**, 76 (2006).
335. Watanabe, S. *et al.* Hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL2Rgamma null mice develop human lymphoid systems and induce long-lasting HIV-1 infection with specific humoral immune responses. *Blood* **109**, 212–218 (2007).

336. Sun, Z. *et al.* Intrarectal transmission, systemic infection, and CD4+ T cell depletion in humanized mice infected with HIV-1. *J. Exp. Med.* **204**, 705–714 (2007).
337. Denton, P. W. *et al.* Antiretroviral pre-exposure prophylaxis prevents vaginal transmission of HIV-1 in humanized BLT mice. *PLoS Med.* **5**, e16 (2008).
338. Berges, B. K., Akkina, S. R., Folkvord, J. M., Connick, E. & Akkina, R. Mucosal transmission of R5 and X4 tropic HIV-1 via vaginal and rectal routes in humanized Rag2-/- gammac -/- (RAG-hu) mice. *Virology* **373**, 342–351 (2008).
339. Hofer, U. *et al.* RAG2-/- gamma(c)-/- mice transplanted with CD34+ cells from human cord blood show low levels of intestinal engraftment and are resistant to rectal transmission of human immunodeficiency virus. *J. Virol.* **82**, 12145–12153 (2008).
340. Akkina, R. *et al.* Humanized Rag1-/-γc-/- Mice Support Multilineage Hematopoiesis and Are Susceptible to HIV-1 Infection via Systemic and Vaginal Routes. *PLOS ONE* **6**, e20169 (2011).
341. Wahl, A. & Garcia, J. V. The use of BLT humanized mice to investigate the immune reconstitution of the gastrointestinal tract. *J. Immunol. Methods* **410**, 28–33 (2014).
342. Choudhary, S. K. *et al.* Suppression of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) viremia with reverse transcriptase and integrase inhibitors, CD4+ T-cell recovery, and viral rebound upon interruption of therapy in a new model for HIV treatment in the humanized Rag2-/-{gamma}c-/- mouse. *J. Virol.* **83**, 8254–8258 (2009).
343. Kwant-Mitchell, A., Ashkar, A. A. & Rosenthal, K. L. Mucosal innate and adaptive immune responses against herpes simplex virus type 2 in a humanized mouse model. *J. Virol.* **83**, 10664–10676 (2009).
344. Neff, C. P., Kurisu, T., Ndolo, T., Fox, K. & Akkina, R. A topical microbicide gel formulation of CCR5 antagonist maraviroc prevents HIV-1 vaginal transmission in humanized RAG-hu mice. *PloS One* **6**, e20209 (2011).
345. Denton, P. W. *et al.* One Percent Tenofovir Applied Topically to Humanized BLT Mice and Used According to the CAPRISA 004 Experimental Design Demonstrates Partial Protection from Vaginal HIV Infection, Validating the BLT Model for Evaluation of New Microbicide Candidates. *J. Virol.* **85**, 7582–7593 (2011).
346. Denton, P. W. *et al.* Systemic administration of antiretrovirals prior to exposure prevents rectal and intravenous HIV-1 transmission in humanized BLT mice. *PloS One* **5**, e8829 (2010).

347. Palmer, B. E. *et al.* In vivo blockade of the PD-1 receptor suppresses HIV-1 viral loads and improves CD4+ T cell levels in humanized mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **190**, 211–219 (2013).
348. Seung, E. *et al.* PD-1 Blockade in Chronically HIV-1-Infected Humanized Mice Suppresses Viral Loads. *PLoS ONE* **8**, (2013).
349. Soper, A. *et al.* Type I Interferon Responses by HIV-1 Infection: Association with Disease Progression and Control. *Front. Immunol.* **8**, (2018).
350. Li, G. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells suppress HIV-1 replication but contribute to HIV-1 induced immunopathogenesis in humanized mice. *PLoS Pathog.* **10**, e1004291 (2014).
351. O'Brien, M., Manches, O. & Bhardwaj, N. Plasmacytoid Dendritic Cells in HIV Infection. *Adv. Exp. Med. Biol.* **762**, 71–107 (2013).
352. Cheng, L. *et al.* Type I interferons suppress viral replication but contribute to T cell depletion and dysfunction during chronic HIV-1 infection. *JCI Insight* **2**,.
353. Zhen, A. *et al.* Stem-cell Based Engineered Immunity Against HIV Infection in the Humanized Mouse Model. *J. Vis. Exp. JoVE* (2016) doi:10.3791/54048.
354. Shimizu, S. *et al.* A highly efficient short hairpin RNA potently down-regulates CCR5 expression in systemic lymphoid organs in the hu-BLT mouse model. *Blood* **115**, 1534–1544 (2010).
355. Ringpis, G.-E. E. *et al.* Engineering HIV-1-resistant T-cells from short-hairpin RNA-expressing hematopoietic stem/progenitor cells in humanized BLT mice. *PloS One* **7**, e53492 (2012).
356. Zhen, A. *et al.* HIV-specific Immunity Derived From Chimeric Antigen Receptor-engineered Stem Cells. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **23**, 1358–1367 (2015).
357. Lindvall, O. *et al.* Human Fetal Dopamine Neurons Grafted Into the Striatum in Two Patients With Severe Parkinson's Disease: A Detailed Account of Methodology and a 6-Month Follow-up. *Arch. Neurol.* **46**, 615–631 (1989).
358. Brooks, D. G., Kitchen, S. G., Kitchen, C. M., Scripture-Adams, D. D. & Zack, J. A. Generation of HIV latency during thymopoiesis. *Nat. Med.* **7**, 459–464 (2001).
359. Korin, Y. D., Brooks, D. G., Brown, S., Korotzer, A. & Zack, J. A. Effects of prostratin on T-cell activation and human immunodeficiency virus latency. *J. Virol.* **76**, 8118–8123 (2002).

360. Brooks, D. G. *et al.* Molecular characterization, reactivation, and depletion of latent HIV. *Immunity* **19**, 413–423 (2003).
361. Brooks, D. G., Arlen, P. A., Gao, L., Kitchen, C. M. R. & Zack, J. A. Identification of T cell-signaling pathways that stimulate latent HIV in primary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 12955–12960 (2003).
362. Sengupta, S. & Siliciano, R. F. Targeting the Latent Reservoir for HIV-1. *Immunity* **48**, 872–895 (2018).
363. Honeycutt, J. B. *et al.* Macrophages sustain HIV replication in vivo independently of T cells. *J. Clin. Invest.* **126**, 1353–1366 (2016).
364. Schnell, G., Joseph, S., Spudich, S., Price, R. W. & Swanstrom, R. HIV-1 replication in the central nervous system occurs in two distinct cell types. *PLoS Pathog.* **7**, e1002286 (2011).
365. Deeks, S. G. HIV: Shock and kill. *Nature* **487**, 439–440 (2012).
366. Kim, Y., Anderson, J. L. & Lewin, S. R. Getting the “kill” into “shock and kill”: strategies to eliminate latent HIV. *Cell Host Microbe* **23**, 14–26 (2018).
367. Kessing, C. F. *et al.* In vivo suppression of HIV rebound by didehydro-Cortistatin A, a “block-and-lock” strategy for HIV-1 cure. *Cell Rep.* **21**, 600–611 (2017).
368. Wang, G., Zhao, N., Berkhout, B. & Das, A. T. CRISPR-Cas based antiviral strategies against HIV-1. *Virus Res.* **244**, 321–332 (2018).
369. Limsirichai, P., Gaj, T. & Schaffer, D. V. CRISPR-mediated Activation of Latent HIV-1 Expression. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **24**, 499–507 (2016).
370. Bialek, J. K. *et al.* Targeted HIV-1 Latency Reversal Using CRISPR/Cas9-Derived Transcriptional Activator Systems. *PloS One* **11**, e0158294 (2016).
371. Zhang, Y. *et al.* CRISPR/gRNA-directed synergistic activation mediator (SAM) induces specific, persistent and robust reactivation of the HIV-1 latent reservoirs. *Sci. Rep.* **5**, 16277 (2015).
372. Yin, C. *et al.* In Vivo Excision of HIV-1 Provirus by saCas9 and Multiplex Single-Guide RNAs in Animal Models. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **25**, 1168–1186 (2017).
373. Zhen, A. *et al.* Targeting type I interferon-mediated activation restores immune function in chronic HIV infection. *J. Clin. Invest.* **127**, 260–268.
374. Deeks, S. G., Odorizzi, P. M. & Sekaly, R.-P. The interferon paradox: can inhibiting an antiviral mechanism advance an HIV cure? *J. Clin. Invest.* **127**, 103–105.

375. Safrit, J. T. *et al.* hu-PBL-SCID mice can be protected from HIV-1 infection by passive transfer of monoclonal antibody to the principal neutralizing determinant of envelope gp120. *AIDS Lond. Engl.* **7**, 15–21 (1993).
376. Parren, P. W. *et al.* Protection against HIV-1 infection in hu-PBL-SCID mice by passive immunization with a neutralizing human monoclonal antibody against the gp120 CD4-binding site. *AIDS Lond. Engl.* **9**, F1-6 (1995).
377. Gauduin, M.-C., Safrit, J. T., Weir, R., Fung, M. S. C. & Koup, R. A. Pre- and Postexposure Protection against Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection Mediated by a Monoclonal Antibody. *J. Infect. Dis.* **171**, 1203–1209 (1995).
378. Andrus, L. *et al.* Passive Immunization with a Human Immunodeficiency Virus Type 1-Neutralizing Monoclonal Antibody in Hu-PBL-SCID Mice: Isolation of a Neutralization Escape Variant. *J. Infect. Dis.* **177**, 889–897 (1998).
379. Deruaz, M. *et al.* Protection of Humanized Mice From Repeated Intravaginal HIV Challenge by Passive Immunization: A Model for Studying the Efficacy of Neutralizing Antibodies In Vivo. *J. Infect. Dis.* **214**, 612–616 (2016).
380. Parsons, M. S., Chung, A. W. & Kent, S. J. Importance of Fc-mediated functions of anti-HIV-1 broadly neutralizing antibodies. *Retrovirology* **15**, (2018).
381. Scheid, J. F. *et al.* Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. *Nature* **458**, 636–640 (2009).
382. Horwitz, J. A. *et al.* Non-neutralizing Antibodies Alter the Course of HIV-1 Infection In Vivo. *Cell* **170**, 637-648.e10 (2017).
383. Gruell, H. & Klein, F. Antibody-mediated prevention and treatment of HIV-1 infection. *Retrovirology* **15**, (2018).
384. Li, Q. & Wood, C. Humanized Mouse Versus Non-human Primate Models of HIV-1 Infection. in *Humanized Mice for HIV Research* (eds. Poluektova, L. Y., Garcia, J. V., Koyanagi, Y., Manz, M. G. & Tager, A. M.) 209–221 (Springer New York, 2014). doi:10.1007/978-1-4939-1655-9_17.
385. Nixon, C. C., Mavigner, M., Silvestri, G. & Garcia, J. V. In Vivo Models of Human Immunodeficiency Virus Persistence and Cure Strategies. *J. Infect. Dis.* **215**, S142–S151 (2017).
386. Garcia, J. V. “Humanized mice for HIV and AIDS research”. *Curr. Opin. Virol.* **19**, 56–

64 (2016).

387. Simon, A. K., Hollander, G. A. & McMichael, A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **282**, (2015).
388. Knibbe-Hollinger, J. S. *et al.* Influence of age, irradiation and humanization on NSG mouse phenotypes. *Biol. Open* **4**, 1243–1252 (2015).
389. Harris, D. T. & Badowski, M. Long Term Human Reconstitution and Immune Aging in NOD-Rag (-)- γ chain (-) Mice. *Immunobiology* **219**, 131–137 (2014).
390. Nomura, T., Watanabe, T. & Habu, S. *Humanized Mice*. (Springer Science & Business Media, 2008).
391. Madrazo, I. *et al.* Transplantation of fetal substantia nigra and adrenal medulla to the caudate nucleus in two patients with Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* **318**, 51 (1988).
392. Hayflick, L. & Moorhead, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **25**, 585–621 (1961).
393. Jacobs, J. P., Jones, C. M. & Baille, J. P. Characteristics of a Human Diploid Cell Designated MRC-5. *Nature* **227**, 168–170 (1970).
394. Provost, P. J. *et al.* An inactivated hepatitis A viral vaccine of cell culture origin. *J. Med. Virol.* **19**, 23–31 (1986).
395. Plotkin, S. A., Cornfeld, D. & Ingalls, T. H. Studies of immunization with living rubella virus. Trials in children with a strain cultured from an aborted fetus. *Am. J. Dis. Child.* **1960** **110**, 381–389 (1965).
396. Brinker, J. P. & Doern, G. V. Comparison of MRC-5 and A-549 cells in conventional culture tubes and shell vial assays for the detection of varicella-zoster virus. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **17**, 75–77 (1993).
397. Alford, C. A., Neva, F. A. & Weller, T. H. VIROLOGIC AND SEROLOGIC STUDIES ON HUMAN PRODUCTS OF CONCEPTION AFTER MATERNAL RUBELLA. *N. Engl. J. Med.* **271**, 1275–1281 (1964).
398. Khan, J. A. *et al.* Fetal liver hematopoietic stem cell niches associate with portal vessels. *Science* **351**, 176–180 (2016).
399. Mikkola, H. K. A. & Orkin, S. H. The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development* **133**, 3733–3744 (2006).
400. Allen, T. M. *et al.* Humanized immune system mouse models: progress, challenges and

- opportunities. *Nat. Immunol.* **20**, 770–774 (2019).
401. Skelton, J. K., Ortega-Prieto, A. M. & Dorner, M. A Hitchhiker's guide to humanized mice: new pathways to studying viral infections. *Immunology* **154**, 50–61 (2018).
 402. Seung, E. & Tager, A. M. Humoral immunity in humanized mice: a work in progress. *J. Infect. Dis.* **208 Suppl 2**, S155–159 (2013).
 403. Alexandre, Y. O. & Mueller, S. N. Stromal cell networks coordinate immune response generation and maintenance. *Immunol. Rev.* **283**, 77–85 (2018).
 404. Malhotra, D., Fletcher, A. L. & Turley, S. J. Stromal and hematopoietic cells in secondary lymphoid organs: partners in immunity. *Immunol. Rev.* **251**, 160–176 (2013).
 405. Stein, J. V. & Nombela-Arrieta, C. Chemokine control of lymphocyte trafficking: a general overview. *Immunology* **116**, 1–12 (2005).
 406. Wang, X. *et al.* Follicular dendritic cells help establish follicle identity and promote B cell retention in germinal centers. *J. Exp. Med.* **208**, 2497–2510 (2011).
 407. Weih, F. & Caamaño, J. Regulation of secondary lymphoid organ development by the nuclear factor-kappaB signal transduction pathway. *Immunol. Rev.* **195**, 91–105 (2003).
 408. Marchesi, F. *et al.* CXCL13 expression in the gut promotes accumulation of IL-22-producing lymphoid tissue-inducer cells, and formation of isolated lymphoid follicles. *Mucosal Immunol.* **2**, 486–494 (2009).
 409. Nochi, T., Denton, P. W., Wahl, A. & Garcia, J. V. Cryptopatches are essential for the development of human GALT. *Cell Rep.* **3**, 1874–1884 (2013).
 410. Lim, A. I. *et al.* Systemic Human ILC Precursors Provide a Substrate for Tissue ILC Differentiation. *Cell* **168**, 1086–1100.e10 (2017).
 411. Chen, Q., Khoury, M. & Chen, J. Expression of human cytokines dramatically improves reconstitution of specific human-blood lineage cells in humanized mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 21783–21788 (2009).
 412. Hu, Z. & Yang, Y.-G. Full reconstitution of human platelets in humanized mice after macrophage depletion. *Blood* **120**, 1713–1716 (2012).
 413. Hu, Z., Van Rooijen, N. & Yang, Y.-G. Macrophages prevent human red blood cell reconstitution in immunodeficient mice. *Blood* **118**, 5938–5946 (2011).
 414. Suwanai, H., Wilcox, M. A., Mathis, D. & Benoist, C. A defective Il15 allele underlies the deficiency in natural killer cell activity in nonobese diabetic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.*

S. A. **107**, 9305–9310 (2010).

415. Fehniger, T. A. *et al.* Acquisition of murine NK cell cytotoxicity requires the translation of a pre-existing pool of granzyme B and perforin mRNAs. *Immunity* **26**, 798–811 (2007).

416. Pek, E. A., Chan, T., Reid, S. & Ashkar, A. A. Characterization and IL-15 dependence of NK cells in humanized mice. *Immunobiology* **216**, 218–224 (2011).

417. Seay, K. *et al.* In Vivo Activation of Human NK Cells by Treatment with an Interleukin-15 Superagonist Potently Inhibits Acute In Vivo HIV-1 Infection in Humanized Mice. *J. Virol.* **89**, 6264–6274 (2015).

418. Bardhi, A. *et al.* Potent In Vivo NK Cell-Mediated Elimination of HIV-1-Infected Cells Mobilized by a gp120-Bispecific and Hexavalent Broadly Neutralizing Fusion Protein. *J. Virol.* **91**, (2017).

419. Pagliuca, F. W. *et al.* Generation of functional human pancreatic β cells in vitro. *Cell* **159**, 428–439 (2014).

420. Shahjalal, H. M. *et al.* Generation of insulin-producing β -like cells from human iPS cells in a defined and completely xeno-free culture system. *J. Mol. Cell Biol.* **6**, 394–408 (2014).

421. Nair, G. & Hebrok, M. Islet formation in mice and men: lessons for the generation of functional insulin-producing β -cells from human pluripotent stem cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **32**, 171–180 (2015).

422. Maehr, R. *et al.* Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 15768–15773 (2009).

423. Worobey, M. *et al.* Island biogeography reveals the deep history of SIV. *Science* **329**, 1487 (2010).

424. Chahroudi, A., Bosinger, S. E., Vanderford, T. H., Paiardini, M. & Silvestri, G. Natural SIV hosts: showing AIDS the door. *Science* **335**, 1188–1193 (2012).

425. Letvin, N. L. *et al.* Induction of AIDS-like disease in macaque monkeys with T-cell tropic retrovirus STLV-III. *Science* **230**, 71–73 (1985).

426. Rhesus Macaque Genome Sequencing and Analysis Consortium *et al.* Evolutionary and biomedical insights from the rhesus macaque genome. *Science* **316**, 222–234 (2007).

427. Yasutomi, Y., Reimann, K. A., Lord, C. I., Miller, M. D. & Letvin, N. L. Simian immunodeficiency virus-specific CD8⁺ lymphocyte response in acutely infected rhesus monkeys. *J. Virol.* **67**, 1707–1711 (1993).

428. Schmitz, J. E. *et al.* Effect of humoral immune responses on controlling viremia during primary infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* **77**, 2165–2173 (2003).
429. Akiyama, H. *et al.* Construction and in vivo infection of a new simian/human immunodeficiency virus chimera containing the reverse transcriptase gene and the 3' half of the genomic region of human immunodeficiency virus type 1. *J. Gen. Virol.* **84**, 1663–1669 (2003).
430. Hatziioannou, T. *et al.* A macaque model of HIV-1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 4425–4429 (2009).
431. Parkin, N. T. & Schapiro, J. M. Antiretroviral drug resistance in non-subtype B HIV-1, HIV-2 and SIV. *Antivir. Ther.* **9**, 3–12 (2004).
432. Giuffre, A. C., Higgins, J., Buckheit, R. W. & North, T. W. Susceptibilities of simian immunodeficiency virus to protease inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 1756–1759 (2003).
433. Watkins, D. I., Burton, D. R., Kallas, E. G., Moore, J. P. & Koff, W. C. Nonhuman primate models and the failure of the Merck HIV-1 vaccine in humans. *Nat. Med.* **14**, 617–621 (2008).
434. Vlasak, J. & Ruprecht, R. M. AIDS vaccine development and challenge viruses: getting real. *AIDS Lond. Engl.* **20**, 2135–2140 (2006).
435. Daza-Vamenta, R., Glusman, G., Rowen, L., Guthrie, B. & Geraghty, D. E. Genetic divergence of the rhesus macaque major histocompatibility complex. *Genome Res.* **14**, 1501–1515 (2004).
436. Otting, N. *et al.* Unparalleled complexity of the MHC class I region in rhesus macaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 1626–1631 (2005).
437. January 2019 DAIT Council-Approved Concepts | NIH: National Institute of Allergy and Infectious Diseases. <https://www.niaid.nih.gov/grants-contracts/january-2019-dait-council-approved-concepts#07>.
438. Shultz, L. D. *et al.* Human Cancer Growth and Therapy In NOD/SCID/IL2R γ null (NSG) Mice. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2014**, 694–708 (2014).

